

Часть 5. Протоонкогены и передача клеточного сигнала

5.1. Онковirusы и онкогены

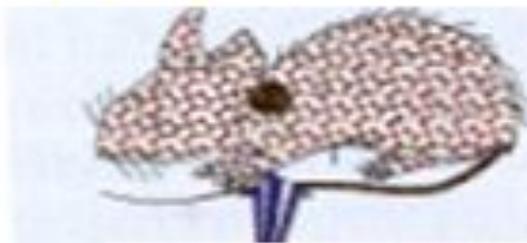
Различия между нормальными и трансформированными клетками



Последовательные изменения в культуре коррелируют с изменениями в степени трансформации

Трансформация

Тр. клетки независимы от субстрата, сыворотки, контактного торможения, изменяют форму, округляются и растут фокусом



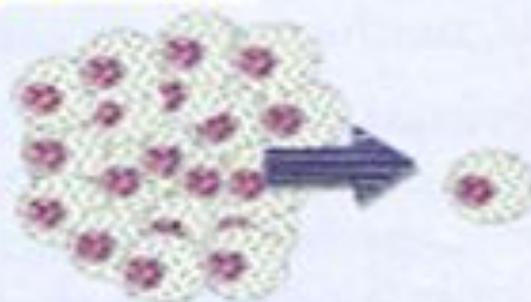
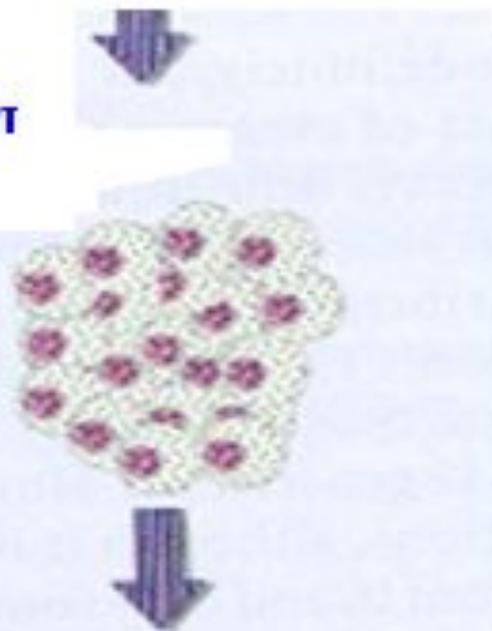
Тр. клетки могут формировать солидную опухоль

Метастазы

Полностью трансформированные клетки становятся мобильными, мигрируют, образуя новые колонии

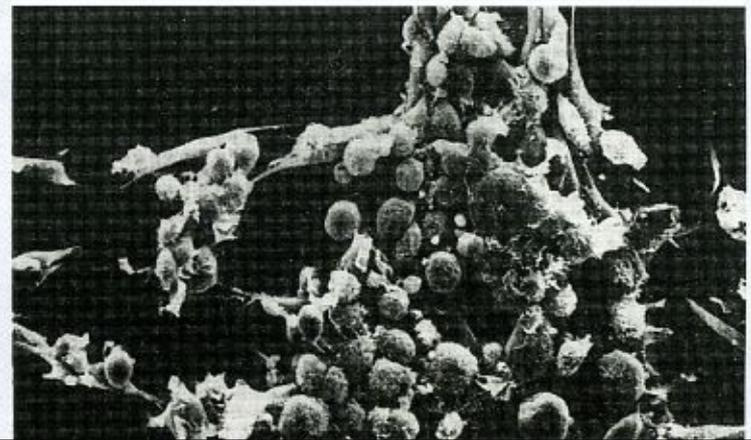
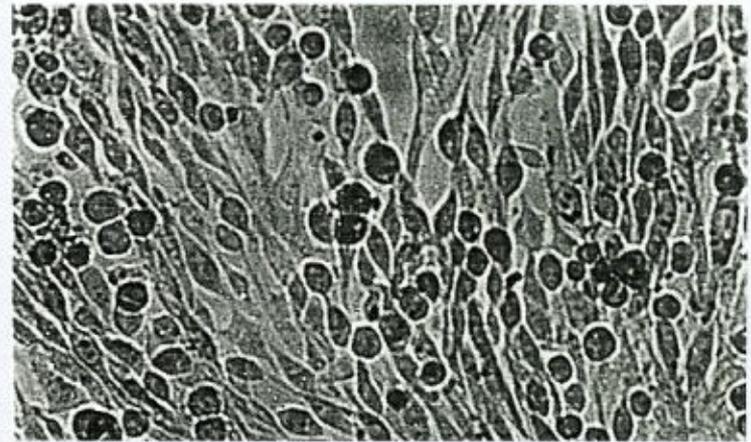
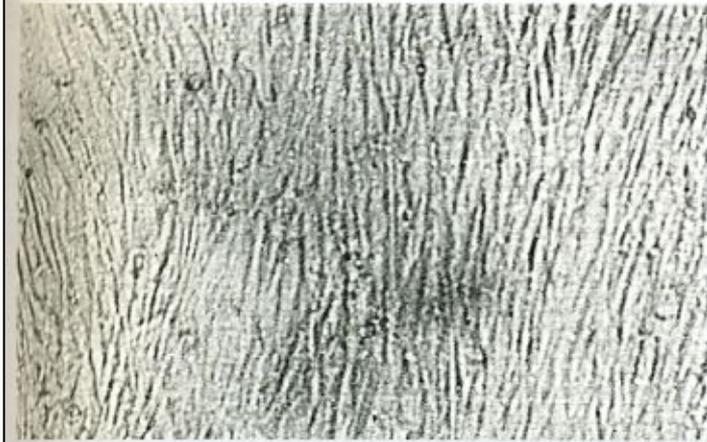


Формирование опухоли в новых местах

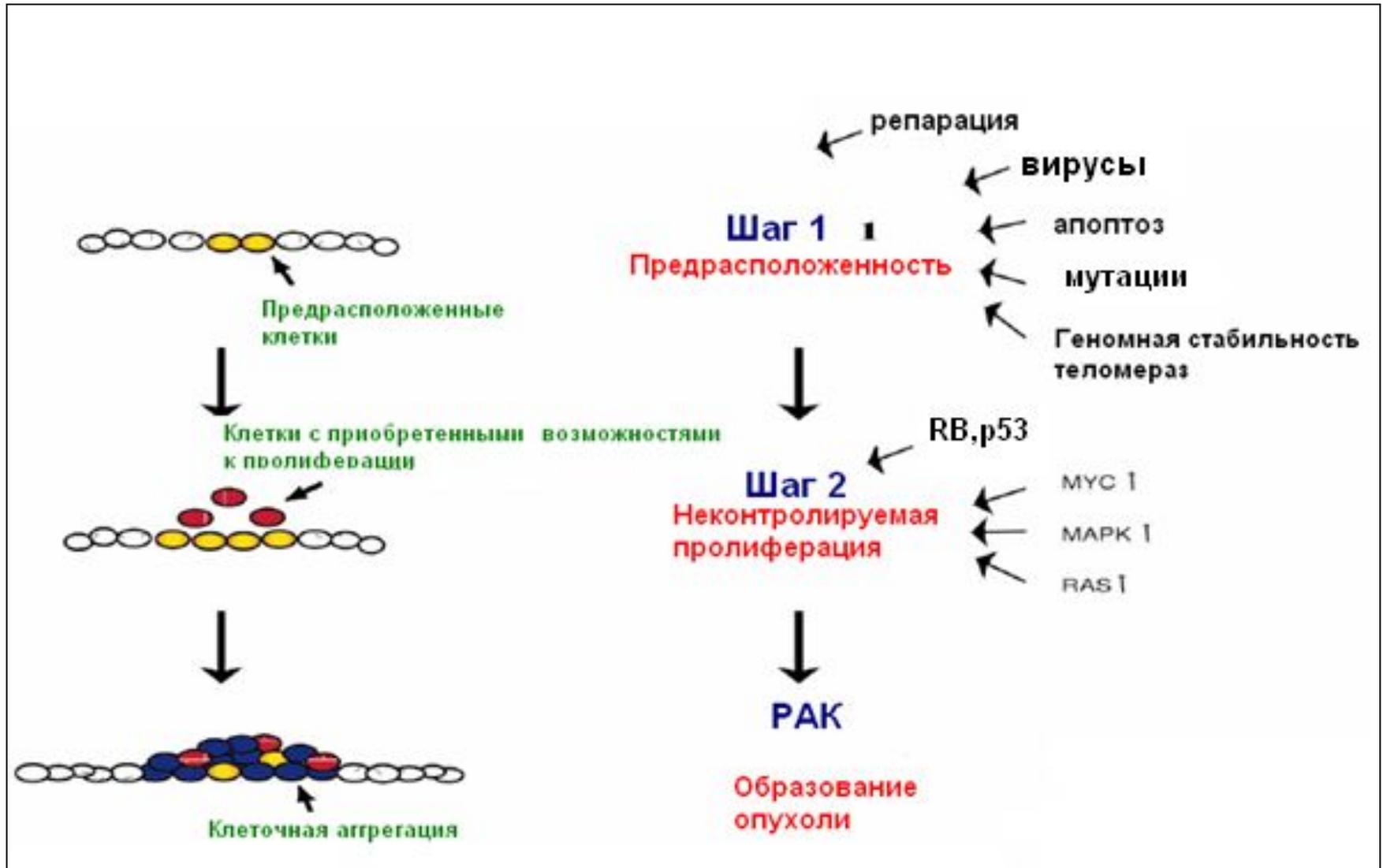


Нормальные фибробласты растут ровным, плоским слоем, тогда как трансформированные клетки растут беспорядочно, формируя массовые скопления.

Слева - норма; справа - трансформированные фибробласты. Вверху - световая микроскопия; внизу - электронная микроскопия

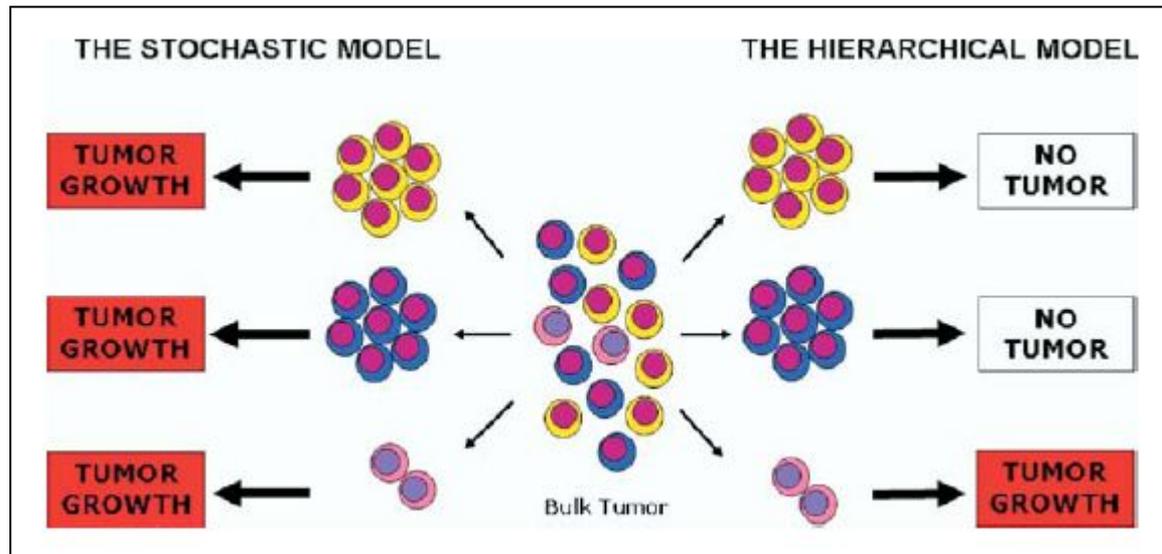


Общая модель возникновения рака



Гипотеза раковых стволовых клеток (РСК)

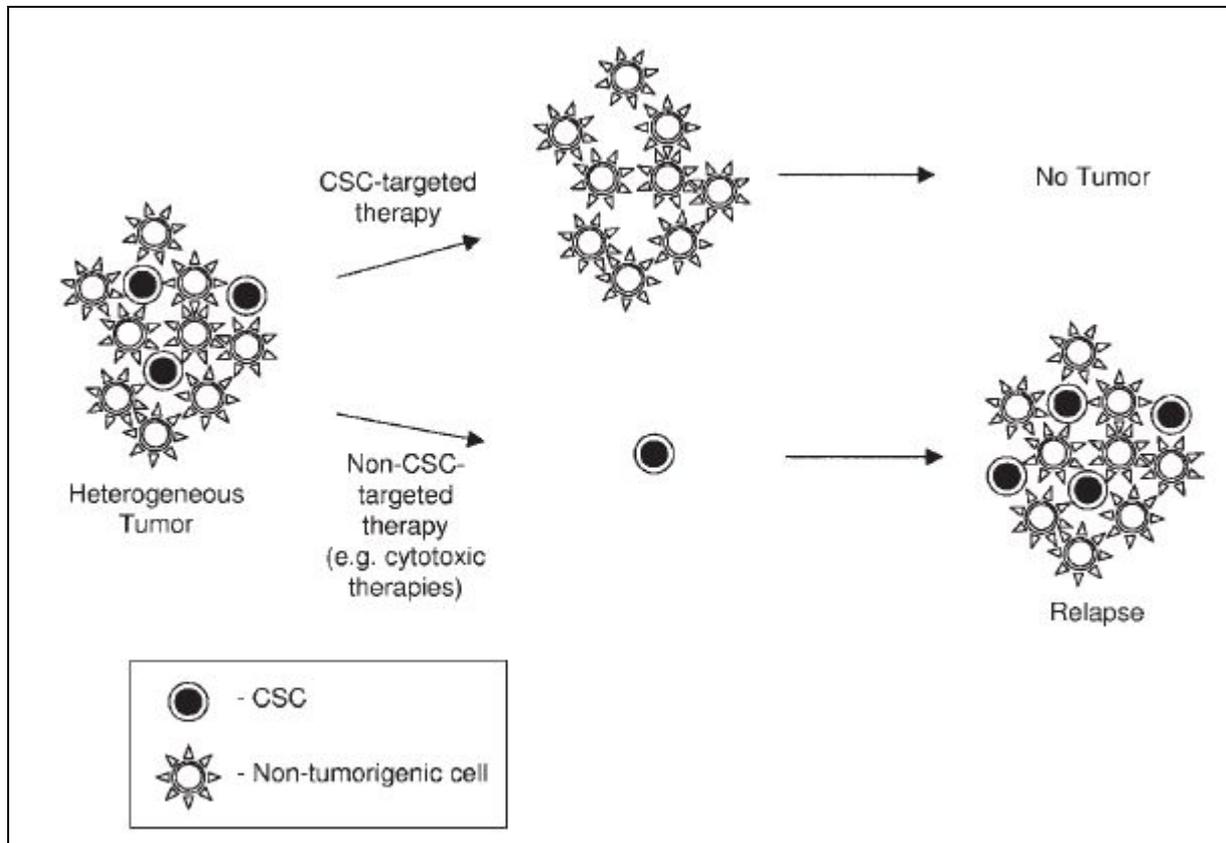
Две модели, объясняющие гетерогенность опухоли



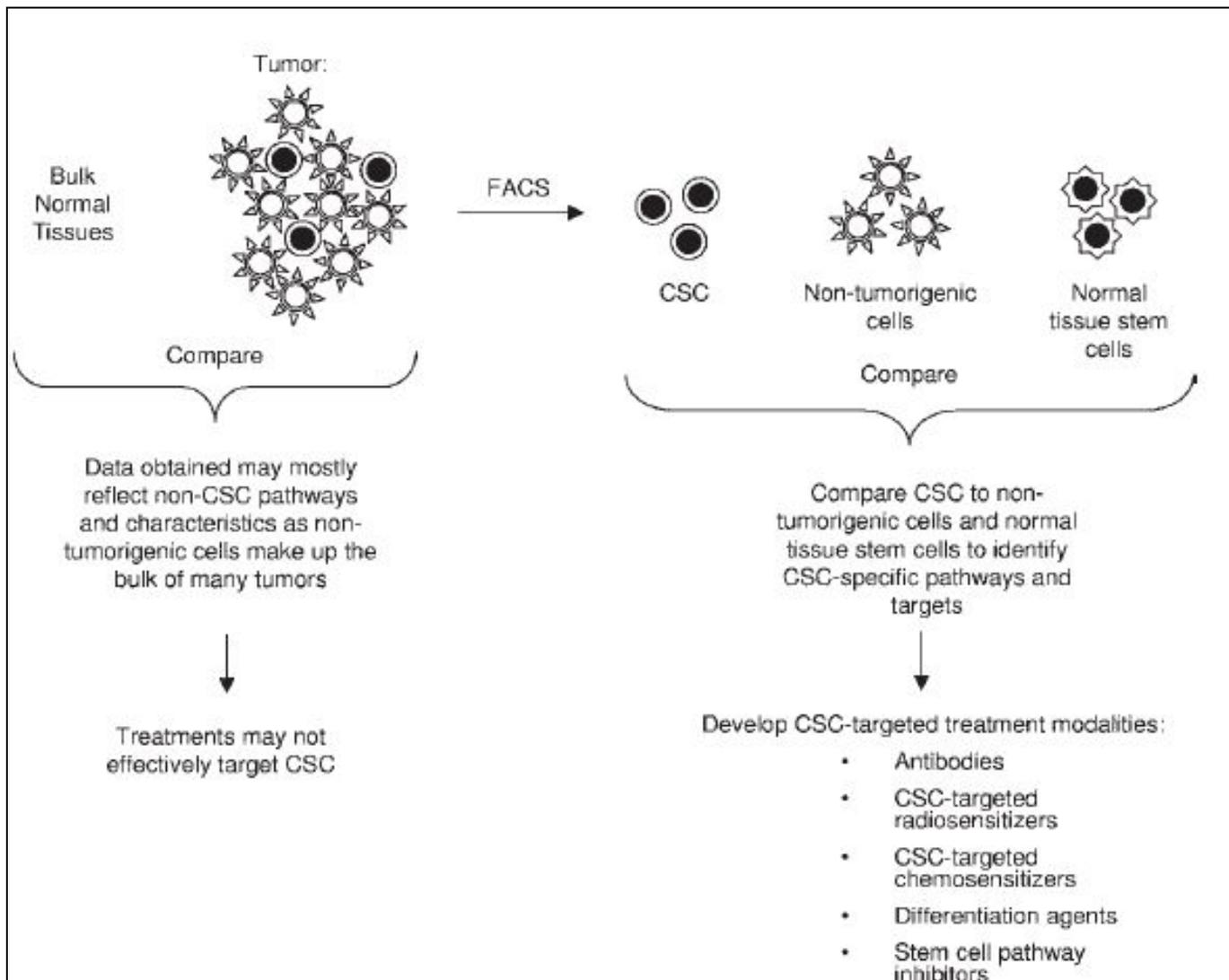
Маркеры для обогащения РСК

CD133	
Brain	
Glioblastoma	(CD133+)
Medulloblastoma	(CD133+)
Colon	(CD133+)
Pancreas	(CD133+)
Lung	(CD133+)
CD44	
Breast (Edinburgh, Scotland)	(CD44+CD24-)
Head and neck	(CD44+)
Colon	(CD44+EpCAM+)
Pancreas	(CD44+CD24+ ESA+.)
CD90	
Hepatocellular	(CD90+)
ABC proteins	
Melanoma	(ABCB5+)
Functional markers	
Side Population	
Mesenchymal	(SP+) ⁴⁶
ALDH	
Breast	(ALDH+)
Colon	(CD44+EpCAM+ALDH1+)

Стратегия в лечении рака



Стратегия в лечении рака



Онковирусы

Два способа инфицирования вирусом

Продуктивная инфекция
(в перм. клетках)

Трансформация
(неперм. клетки)

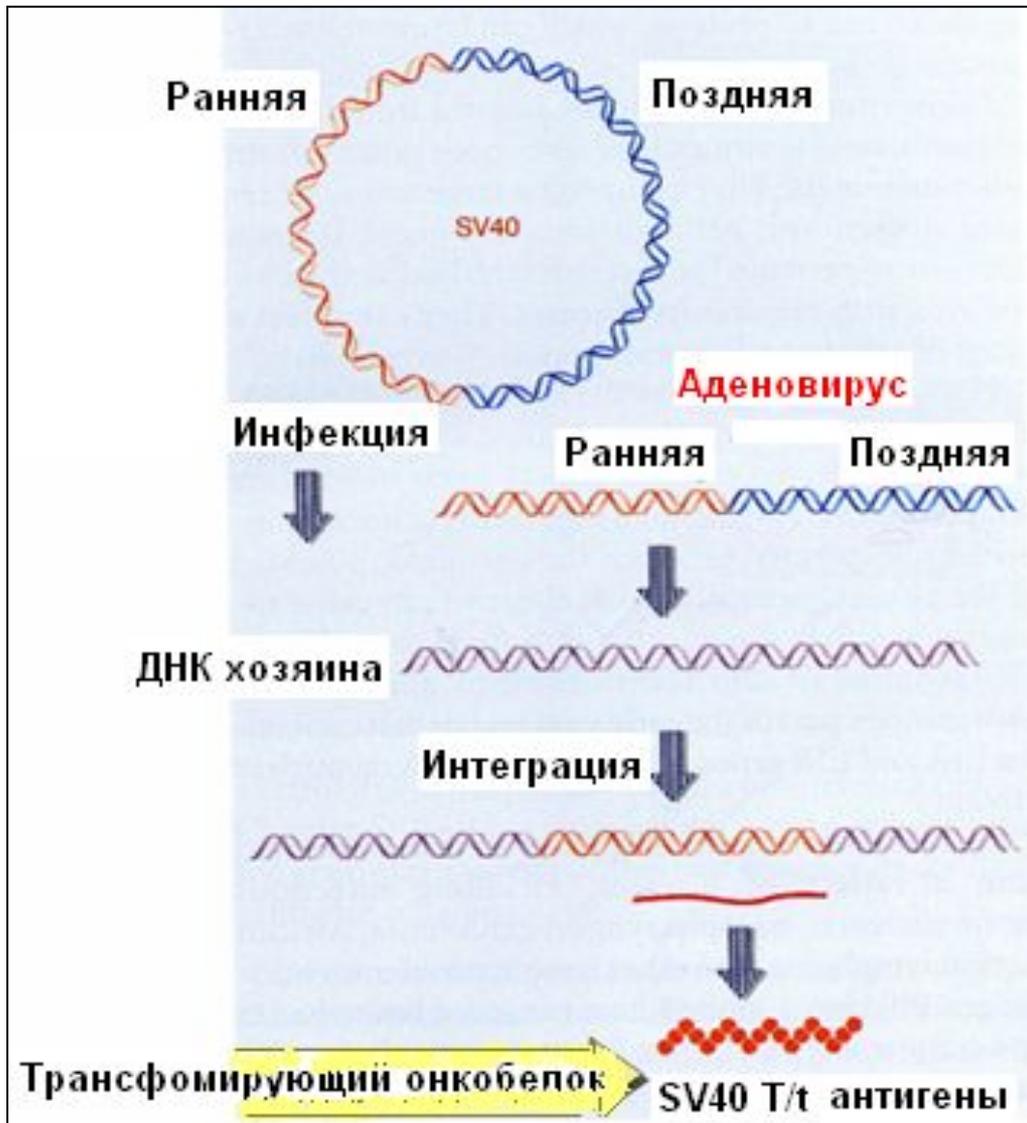


Пермиссионные клетки продуктивно инфицируются ДНК онковируса, что сопровождается вступлением в КЦ, тогда как непермиссионные клетки трансформируются с изменением фенотипа

Трансформирующие вирусы, несущие онкогены

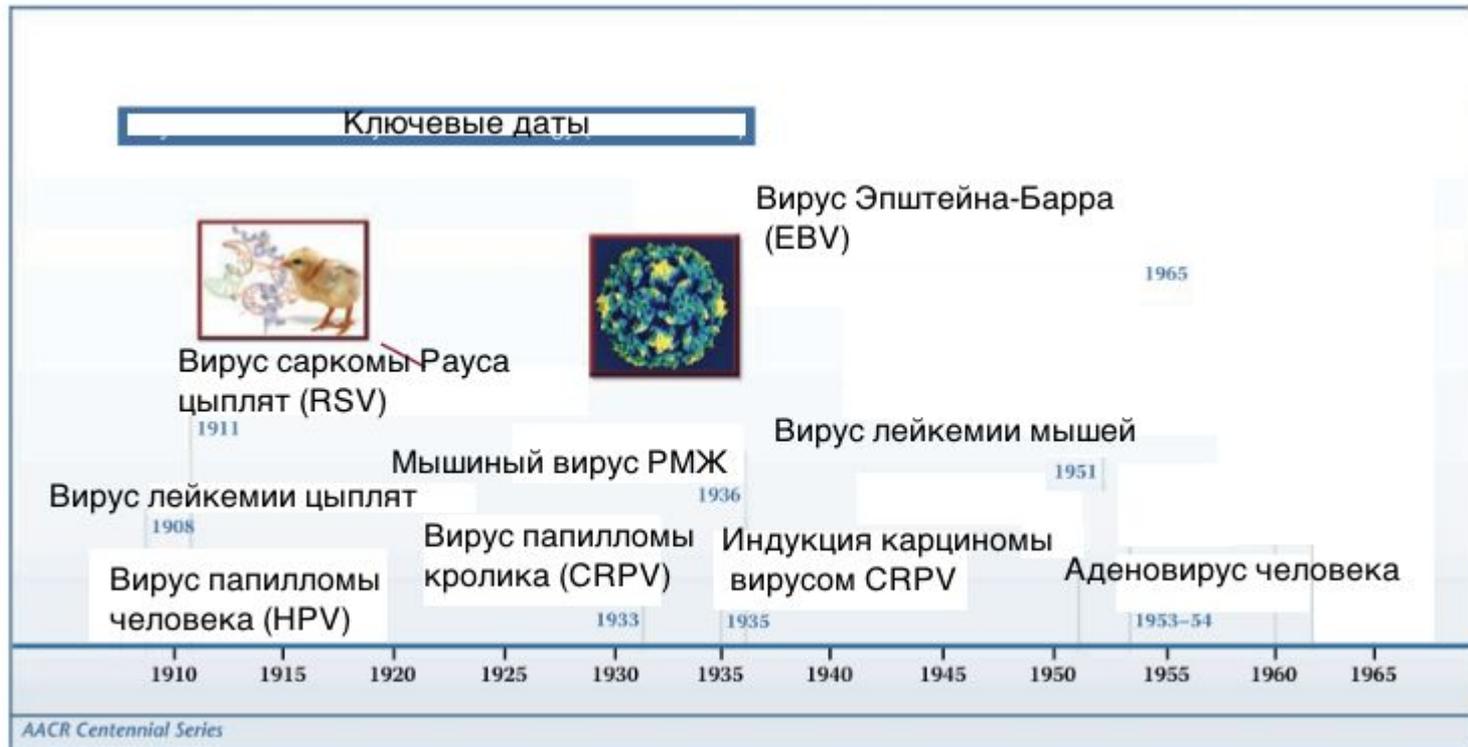
Класс вируса	Тип вируса	Размер генома	Онкогены	Происхождение онкогена	Действие
Полиома	dsДНК	5-6 kb	T-АГ	Ранний вирусный ген	Инактивации РСГ
HPV	dsДНК	около 8 kb	E6 и E7	Ранний вирусный ген	Инактивации РСГ
Адено-вирус	dsДНК	около 37 kb	E1A, E1B	Ранний вирусный ген	Инактивации РСГ
Вирус Эпштейн Барра	dsДНК	160 kb	BNLF1	Латентный вирусный ген	Инактивации РСГ
Ретро-вирусы	ssРНК	6-9 kb	индивидуальные	Клеточное	Активация ПО

Трансформация вирусом



Клетки, трансформируемые полиома вирусом или аденовирусом, содержат вирусную последовательность, которая включает раннюю область, интегрированную в геном хозяина. Сайты интеграции случайны.

История вирусного канцерогенеза (1)



История вирусного канцерогенеза (2)



Семейство онкогенных вирусов	Признанные онковирусы	Вирусы-кандидаты
Adenoviridae		Подтипы А, В, С
Flaviviridae	HCV	
Hepadnaviridae	HBV	
Herpesviridae	EBV, KSHV/HHV-8	
Papillomaviridae	HPV (высокий риск)	Другие типы HPV
Retroviridae		
Simple complex	HNLV-1	XMRV, HMTV

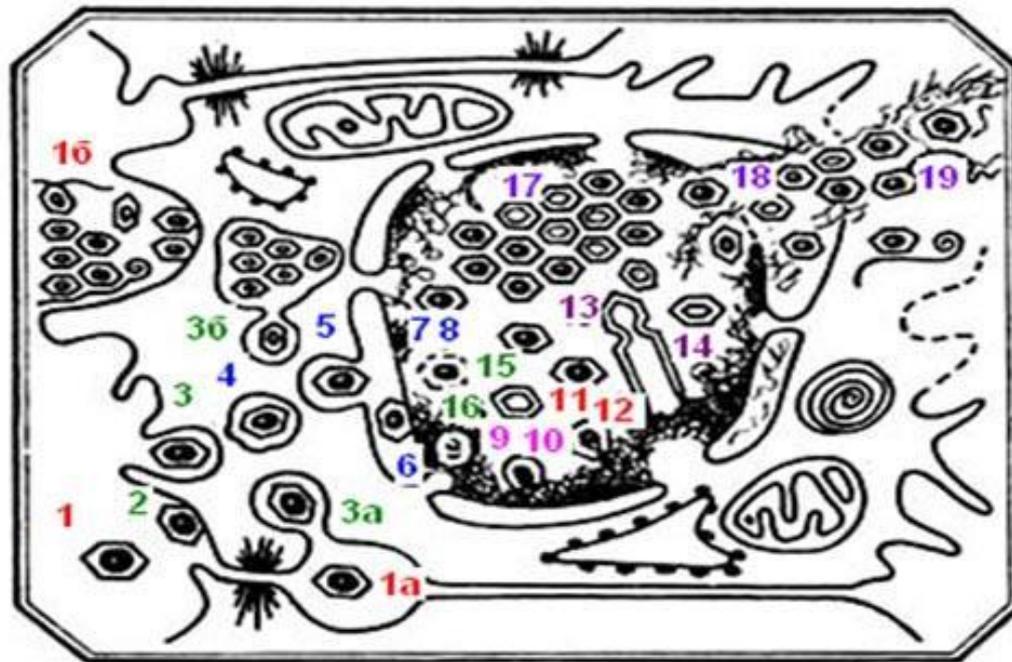
ALV/ASV, avian leukosis-sarcoma virus group; BLV, bovine leukemia virus; BKV, BK virus; BPV, bovine papillomavirus; FeLV/FeSV, feline leukemia-sarcoma virus group; GSHV, ground squirrel hepatitis virus; HERVs, human endogenous retroviruses; HMTV, human mammary tumor virus; HVS, herpesvirus saimiri; JCV, JC virus; MCPyV, Merkel cell polyomavirus; MLV/MSV, murine leukemia-sarcoma virus group; MMTV, mouse mammary tumor virus; MuoHV, murine

Взаимодействие вирусных и клеточных белков

Вирус	Вирусный онкобелок	Клеточная мишень
SV40	Large T antigen Small t-antigen	p53, Rb PP2A
Polyoma	Large T-antigen Middle T-antigen Small t-antigen	Rb Src, PI3K, PLC- γ , Shc PP2A
Adeno	E1A E1B-55K	Rb p53
Adeno type 9	E4-ORF1	Dlg1, PATJ, ZO-2, MAGI-1, MUPP1
HPV	E6 E7	p53, Dlg1, Scribble, PATJ, MAGI-1, MUPP1 Rb
HTLV-1	Tax	NF κ B, p300/CBP, Dlg1, Scribble
BPV	E5	PDGF β receptor
EBV	LMP1	TRAFs

СОКРАЩЕНИЯ:

Adeno, adenovirus; BPV, bovine papillomavirus; PDGF, platelet-derived growth factor; PI3K, phosphatidylinositol-3 kinase; Polyoma, mouse polyomavirus; PLC- γ , phospholipase C- γ ; PP2A, protein phosphatase 2A; TRAF, tumor necrosis factor receptor-associated factor.



Онкогенный вирус полиомы

1 — внеклеточный вирион; **1a** — внеклеточный вирион, локализующийся в межклеточном канале; **1б** — внеклеточный вирион, адсорбированный на мембранных компонентах разрушенной клетки; **2** — адсорбция вириона на свободной клеточной поверхности; **3** — фагоцитоз вириона; **3a** — фагоцитоз вириона из межклеточного канала; **3б** — фагоцитоз вириона из гигантской внутриплазматической фагосомы; **4** — внутрицитоплазматическая фагосома, содержащая вирион; **5,6** — проникновение вирионов в перинуклеарное пространство; **7,8** — внутриядерный виропласт; **9,10** — формирование нуклеокапсидов по периферии виропласта; **11** — полный вирион; **12** — трубчатая форма вируса; **13** — предполагаемая фрагментация трубчатых форм вируса на полые «сферические»; **14** — полные формы вируса; **15** — диффузное внутриядерное скопление вирионов; **16** — anomальная форма вируса; **17** — кристаллоподобное внутриядерное скопление полных и полых форм вируса; **18** — выход полного вирусного скопления в перинуклеарное пространство; **19** — выход вирусного скопления в цитоплазму и во внеклеточное пространство.

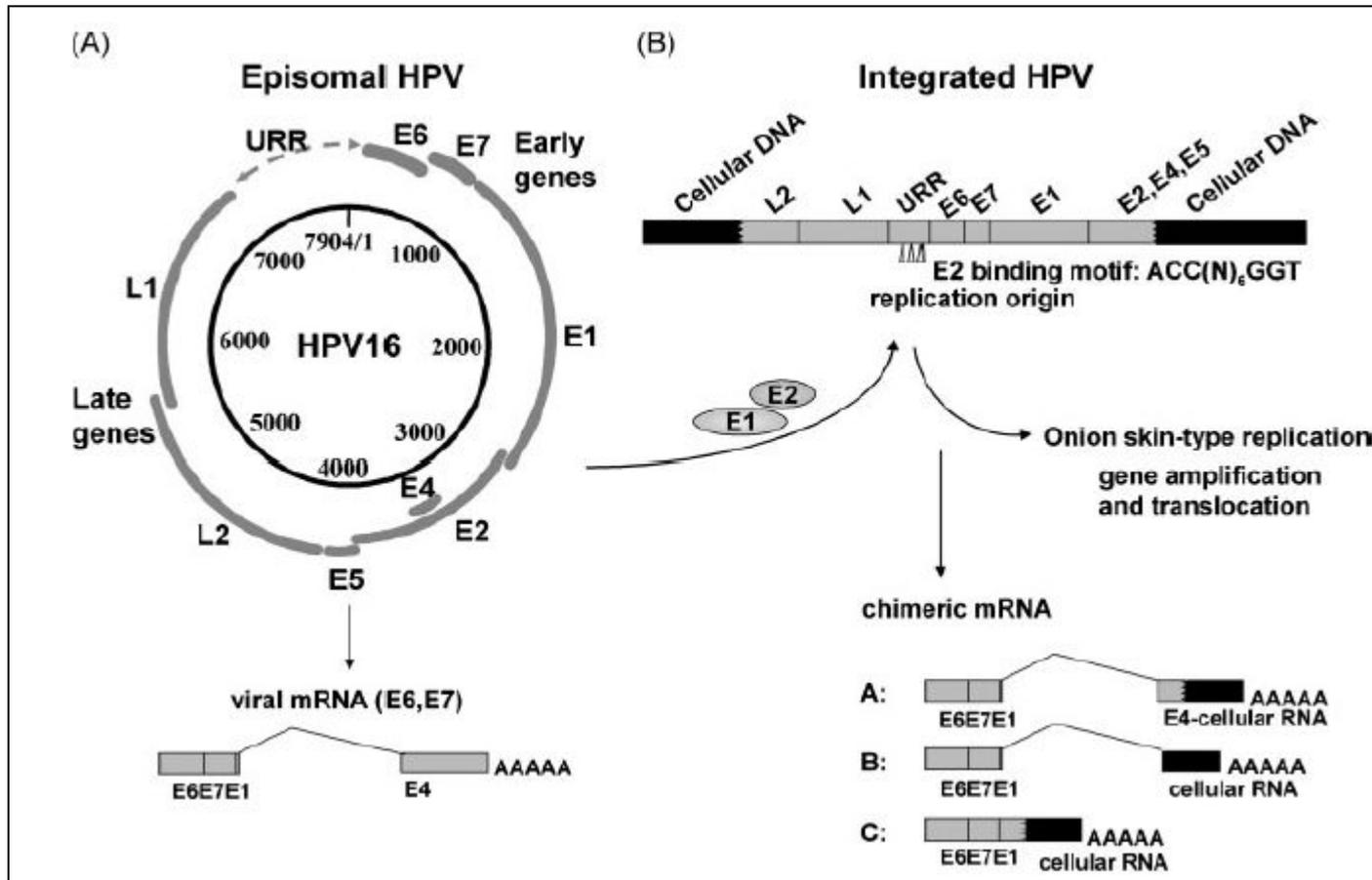
Вирус папилломы человека (HPVs)

**Причина рака шейки матки (90 %
случаев)**

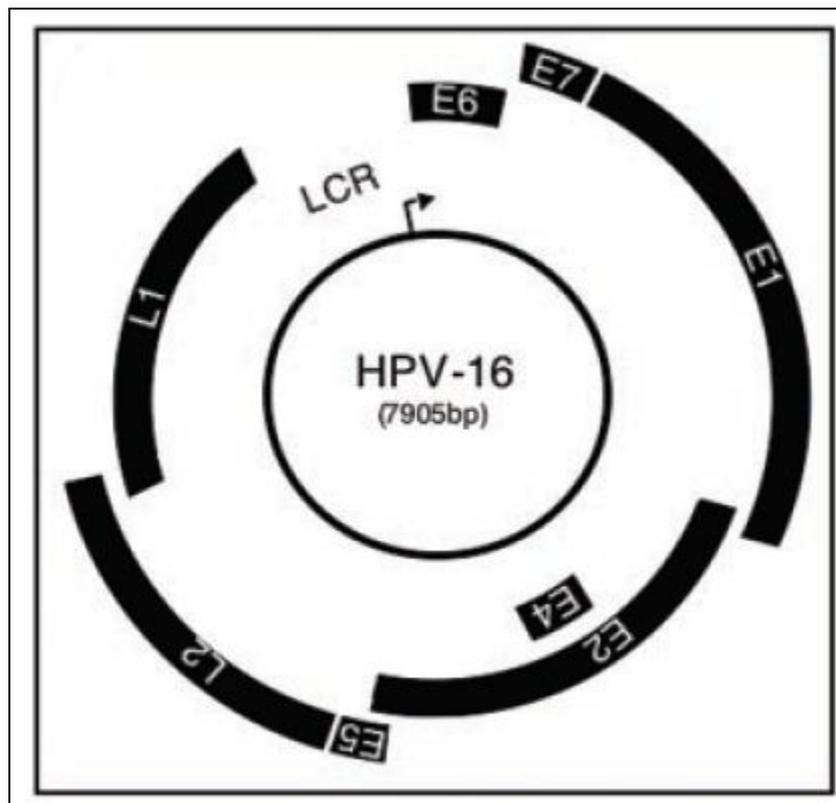
Классификация HPVs



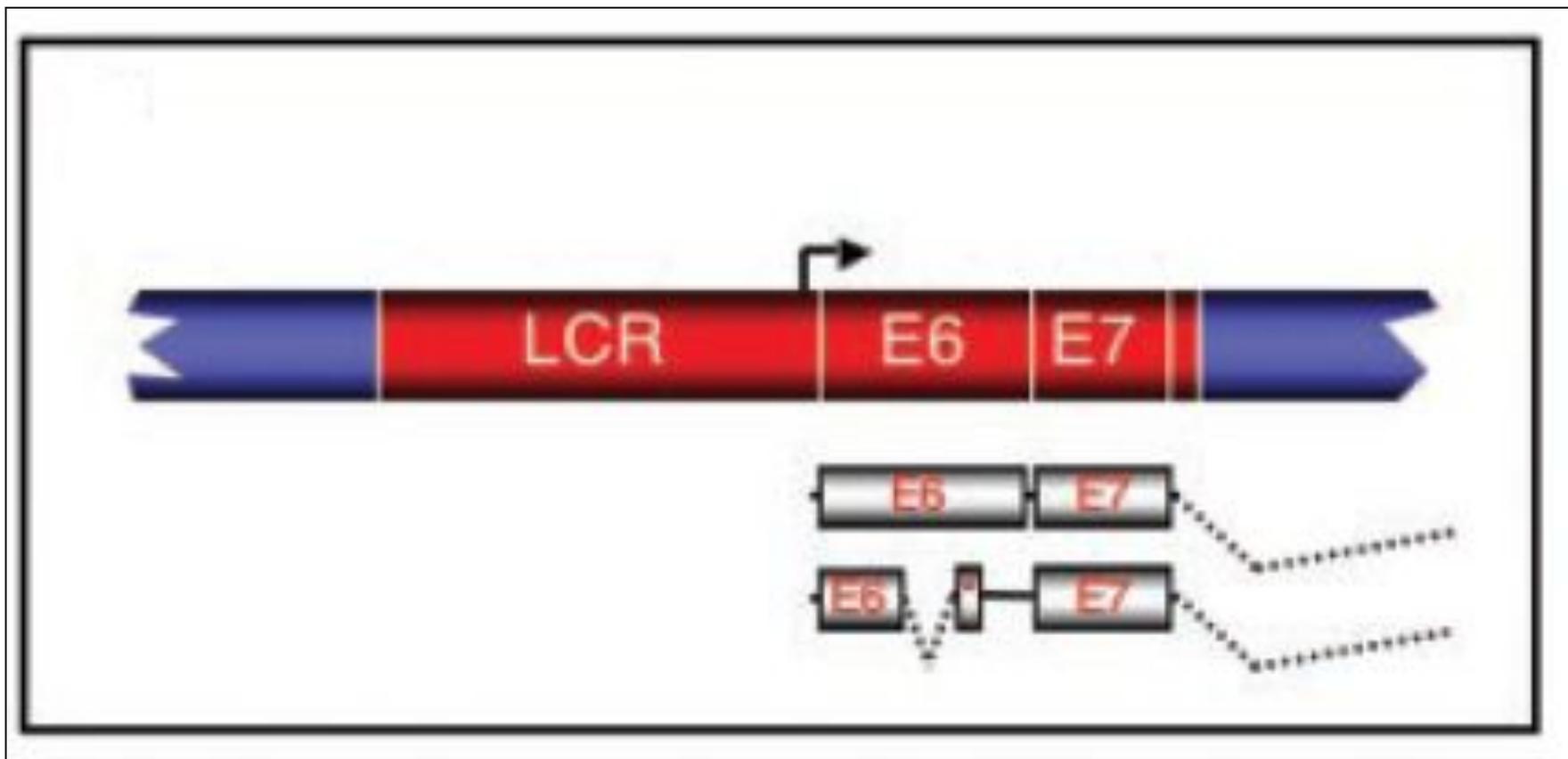
Организация эписомального и интегрированного HPV



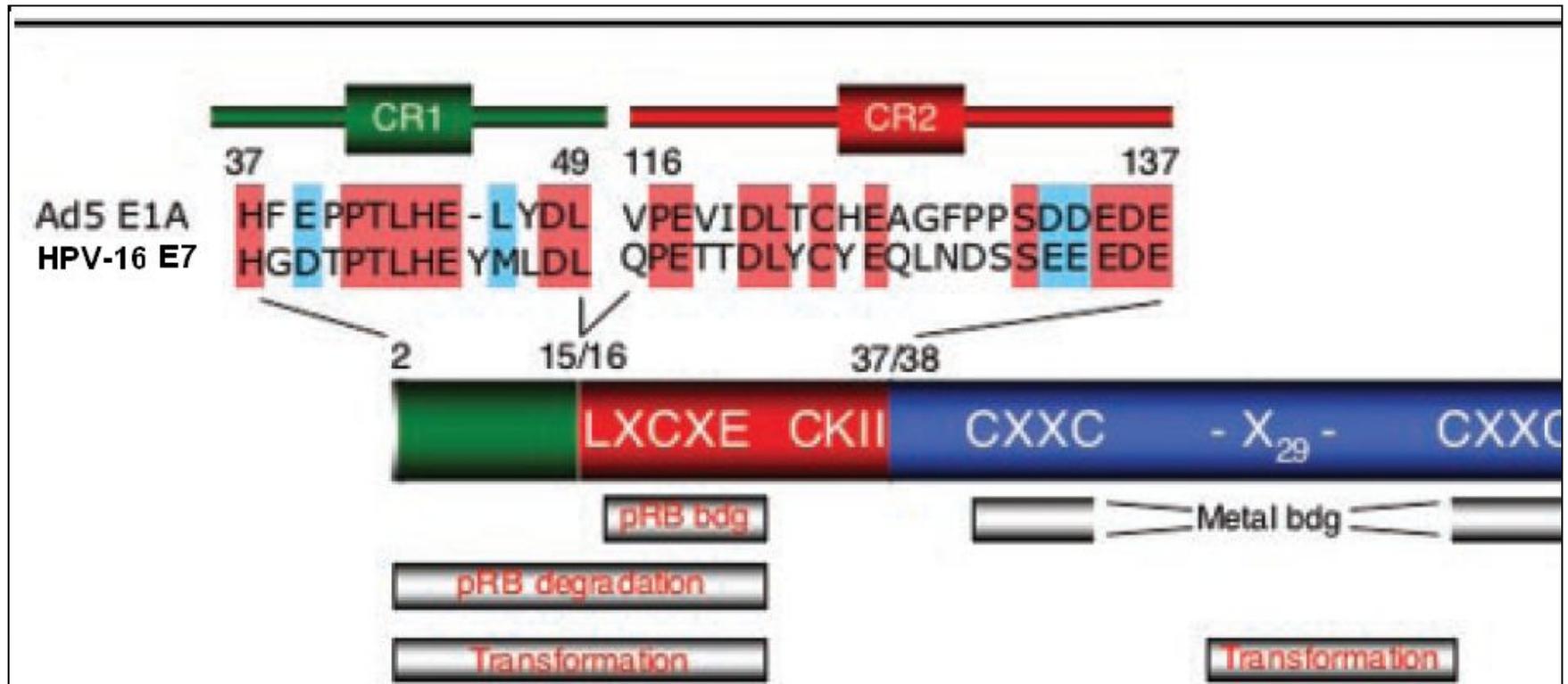
Геном вируса HPV-16



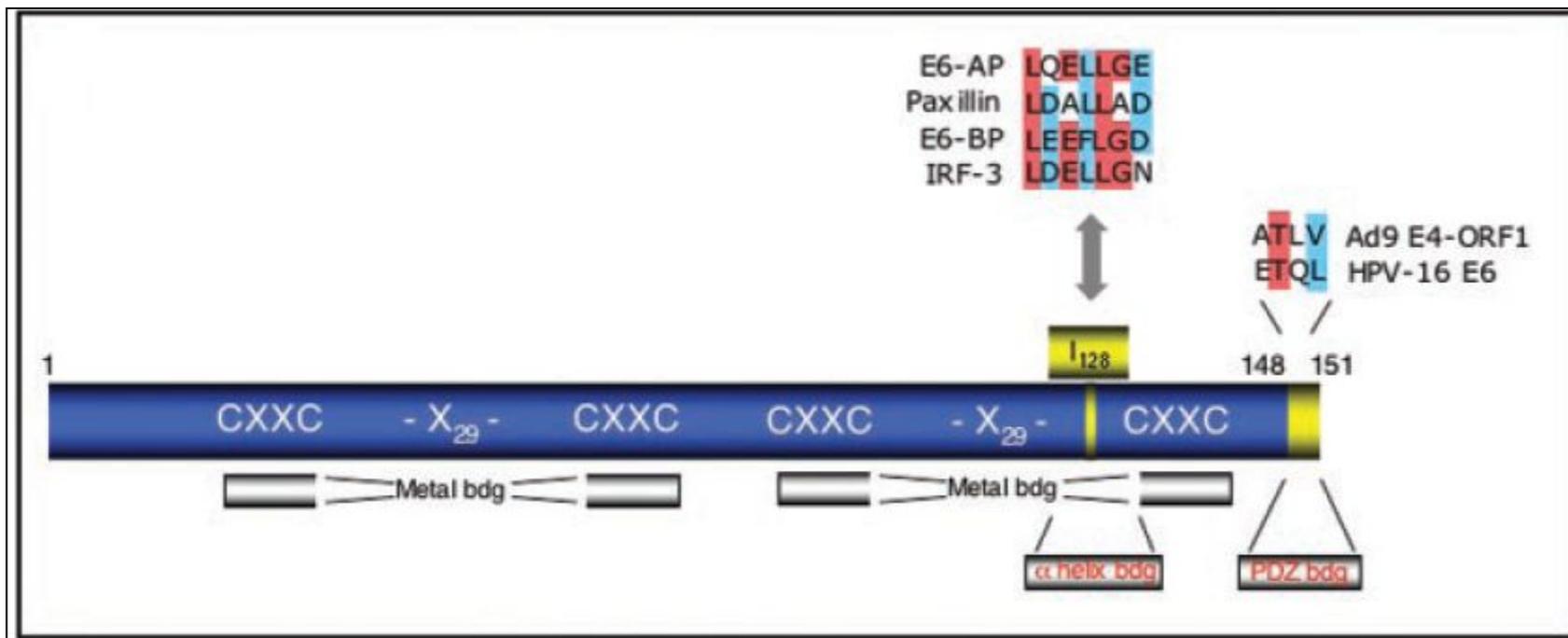
Схематическая структура мини-генома HPV-16



Структура белка E7



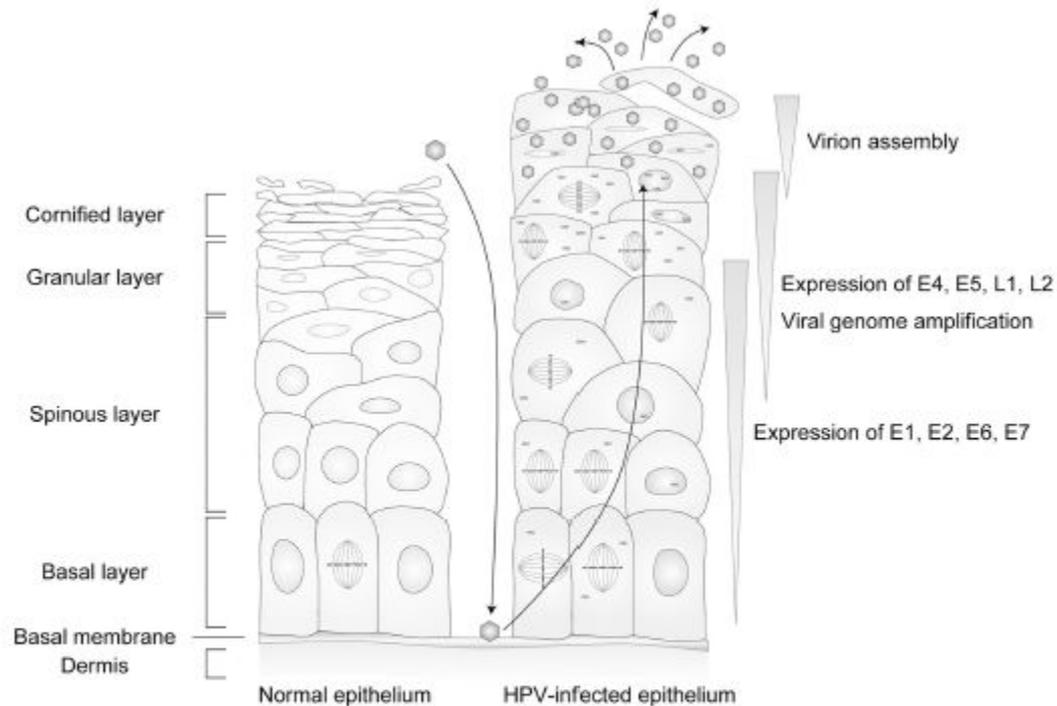
Структура белка E7 (С-конец)



Функции вирусных белков

Function in viral lifecycle	Activities	Target factor
E1		
Replication of viral genome	DNA-binding activity, helicase activity, ATPase	RPA, topoisomerase, polymerase alpha-primase
E2		
Transcription of viral genes		
Replication of viral genome	Transactivation/transrepression, DNA-binding activity, DNA segregation in mitotic cell	Brd4, ChIR1
Maintenance of viral genome		
E6		
Reactivation of cellular replication mechanisms		
Proliferation, immortalization, inhibition of apoptosis	Interaction with various cellular proteins	p53, ADA3, p300/CBP, E6AP, SP1, c-Myc, NFX1-91, TERT, FAK, FADD, Caspase 8, BAX, BAK, IRF3, PDZ domain proteins
Maintenance of viral genome		
E7		
Reactivation of cellular replication mechanisms		
Proliferation, genomic instability, inhibition of apoptosis	Interaction with various cellular proteins	RB, p107, p130, HDAC, E2F6, p21, p27, CDK/cyclin, ATM, ATR, gamma-tubulin
Maintenance of viral genome		
E4		
Unknown	Destruction of keratin network, induction of G ₂ M arrest of cell cycle	Cytokeratin 8/18
E5		
Possibly involved in proliferation and/or inhibition of apoptosis	Affection of cellular signaling pathway	EGFR, PDGFR, V-ATPase, MHC1, TRAIL receptor, FAS receptor
L1		
Major capsid protein		
L2		
Minor capsid protein		

Жизненный цикл HPV

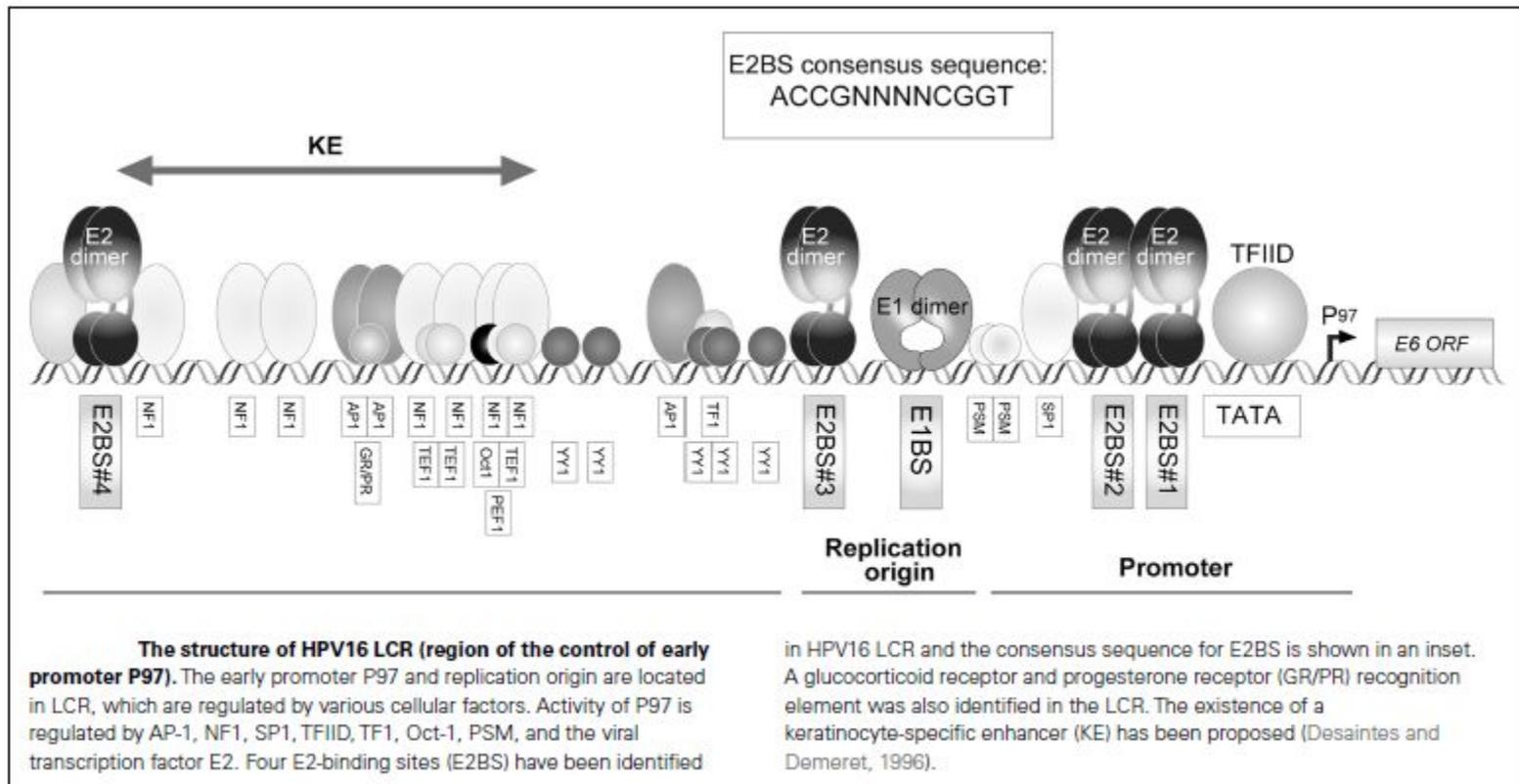


HPVs

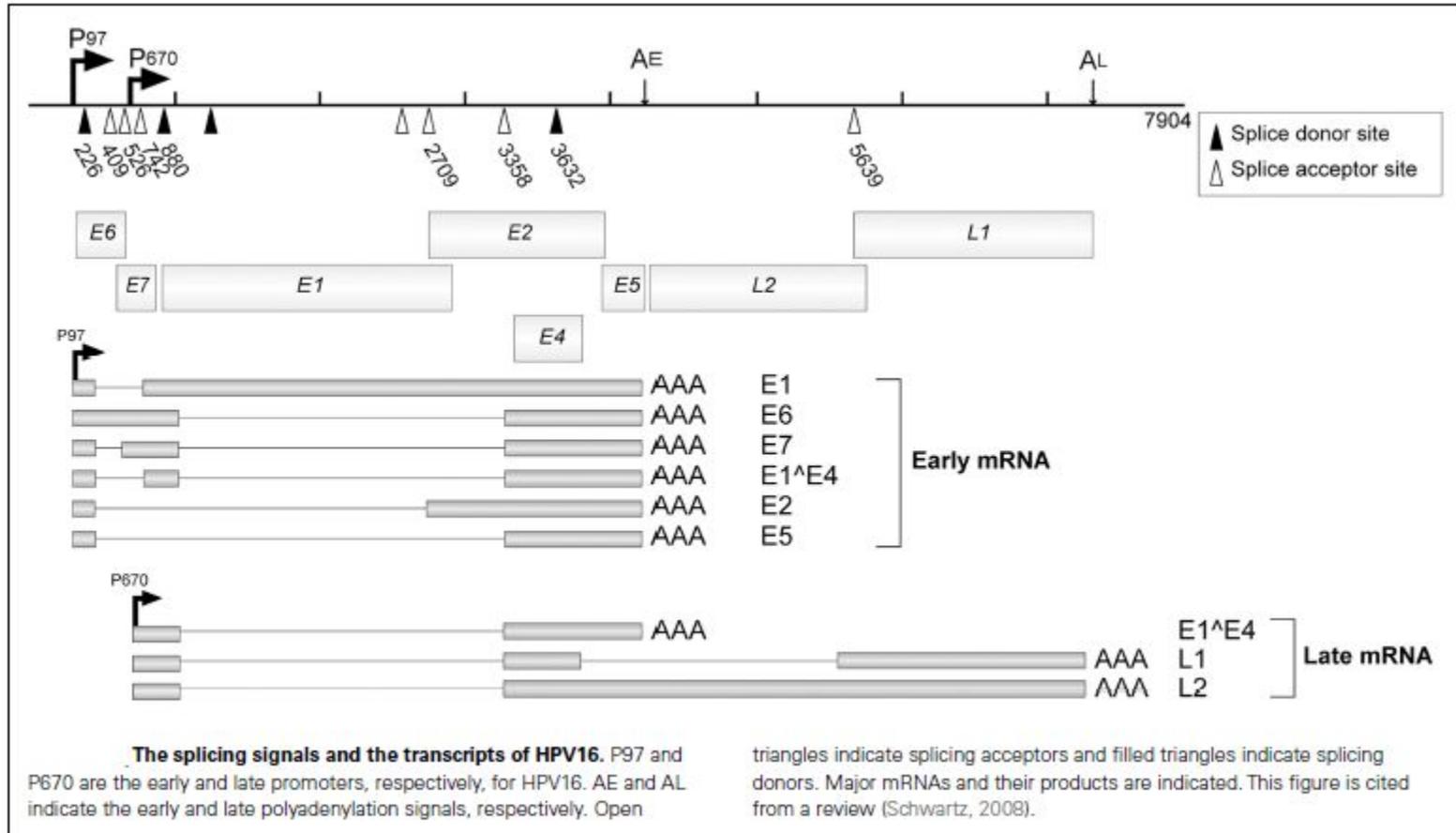
infect specifically the cells in the basal layer of the stratified epithelium through lesions. Viral genomes are maintained as episomal DNA in the nuclei of infected cells. The viral lifecycle is

strictly controlled by host cell differentiation, and the late lifecycle (productive lifecycle) occurs in upper layers of the epithelia that are terminally differentiated, and the progenitor virions are released from the cornified keratinocytes.

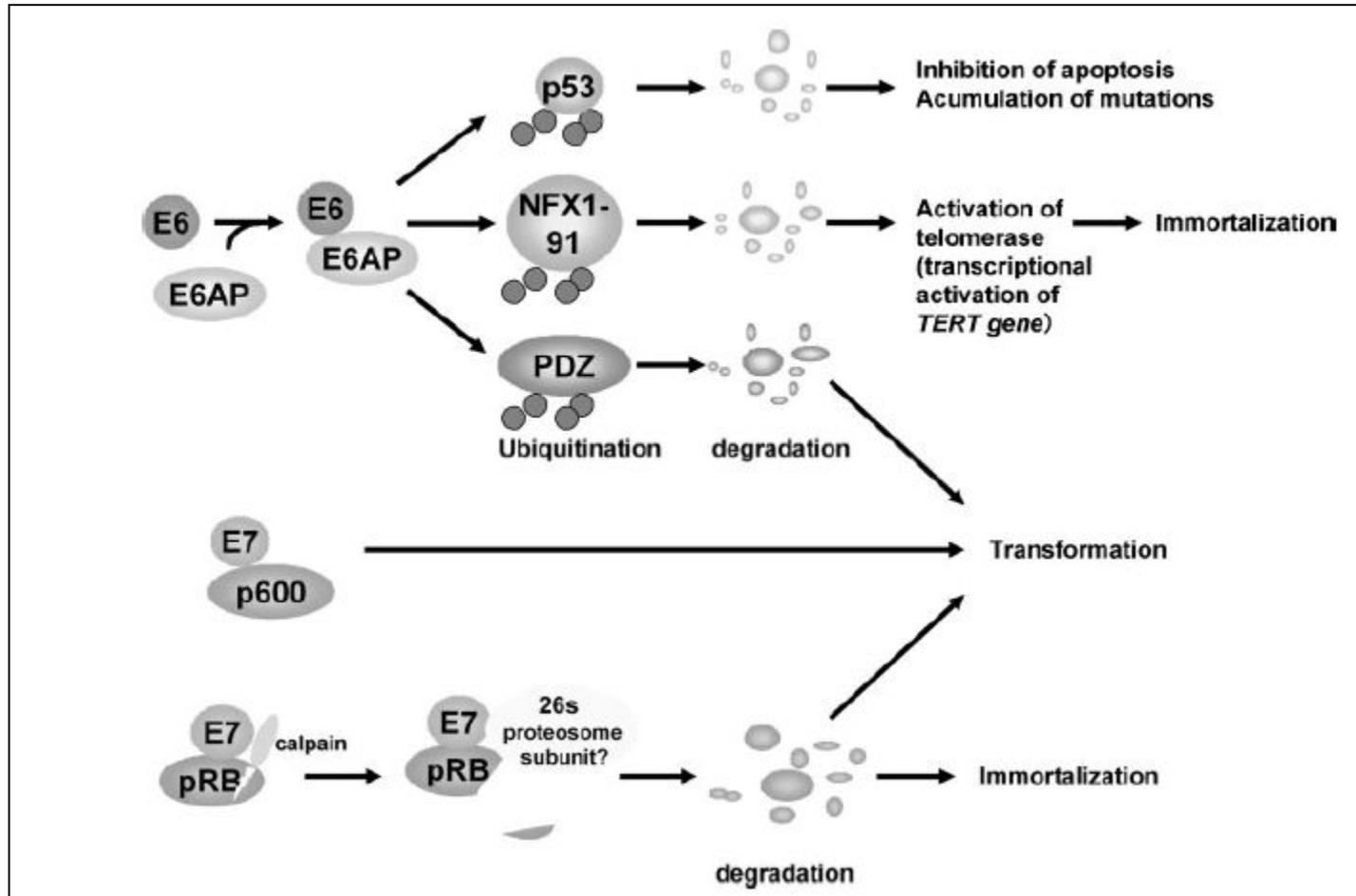
Структура регуляторного райтона (long control region: LCR)



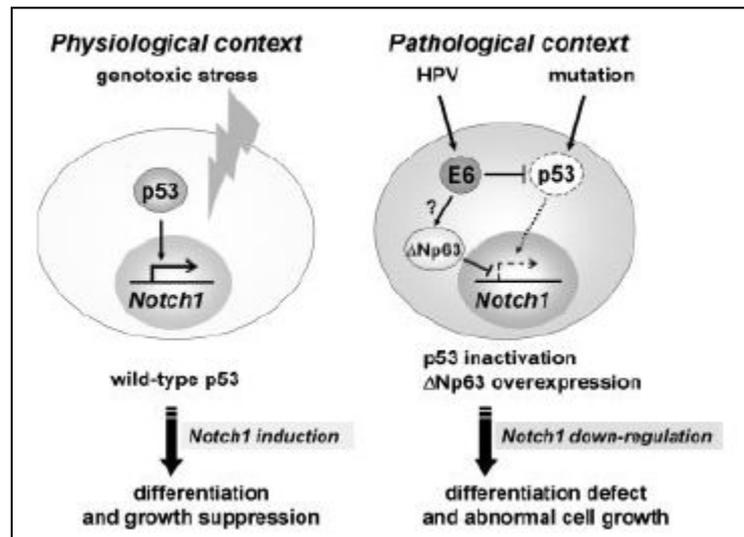
Транскрипты HPV16



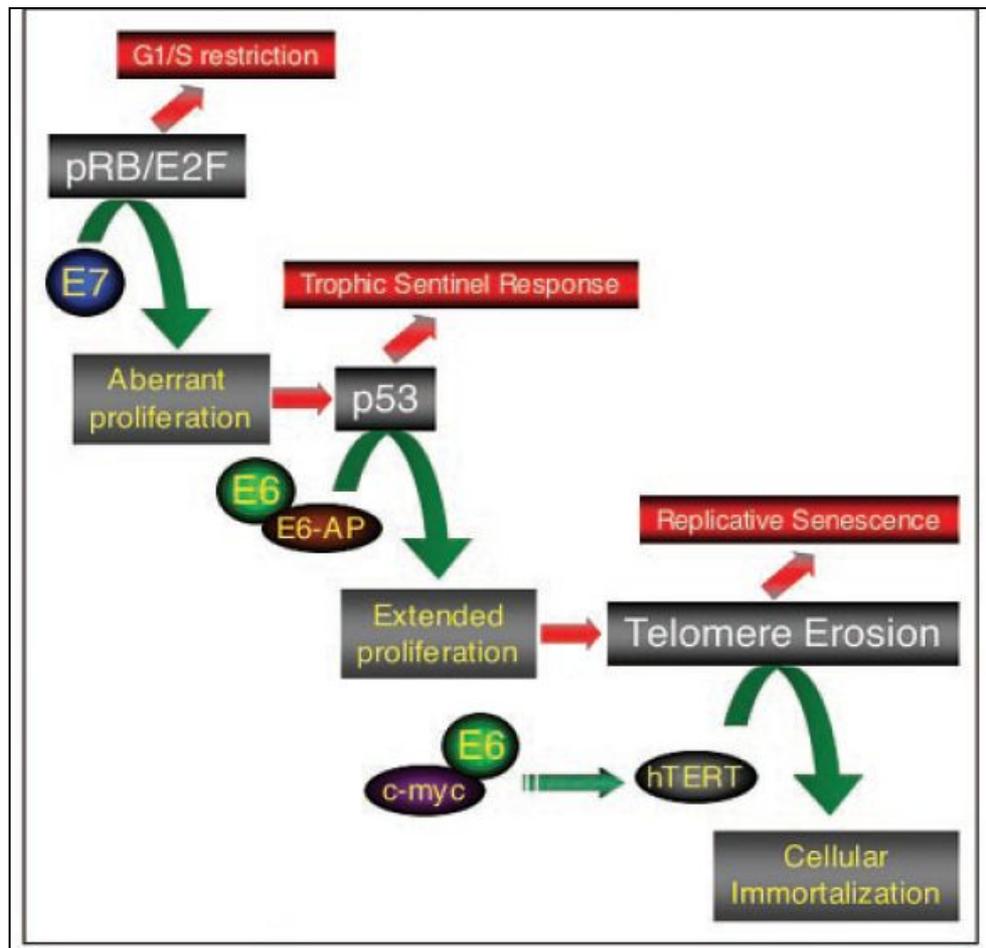
Механизм действия HPV белков E6 и E7



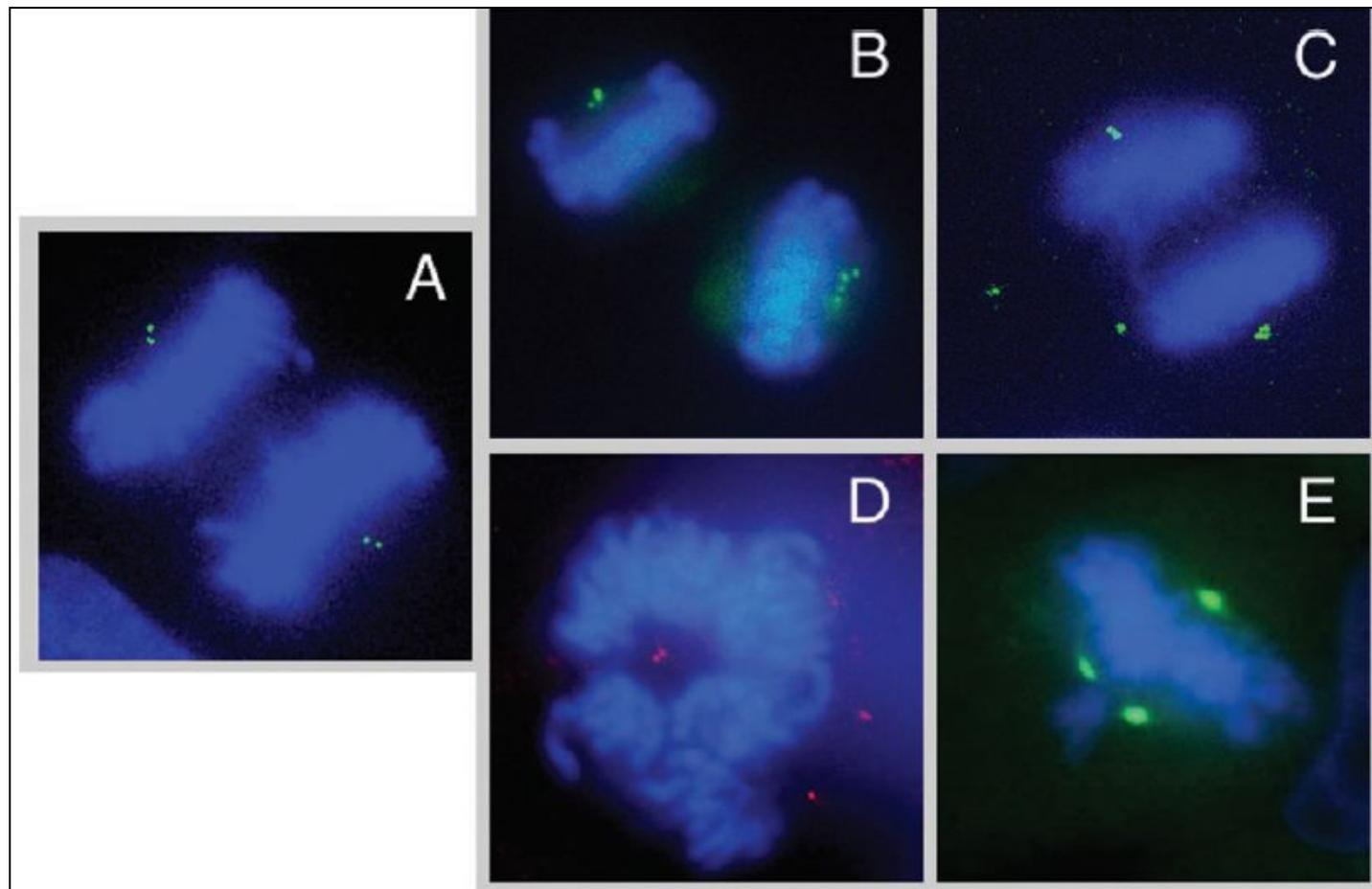
Роль NOTCH1 белка в канцерогенезе



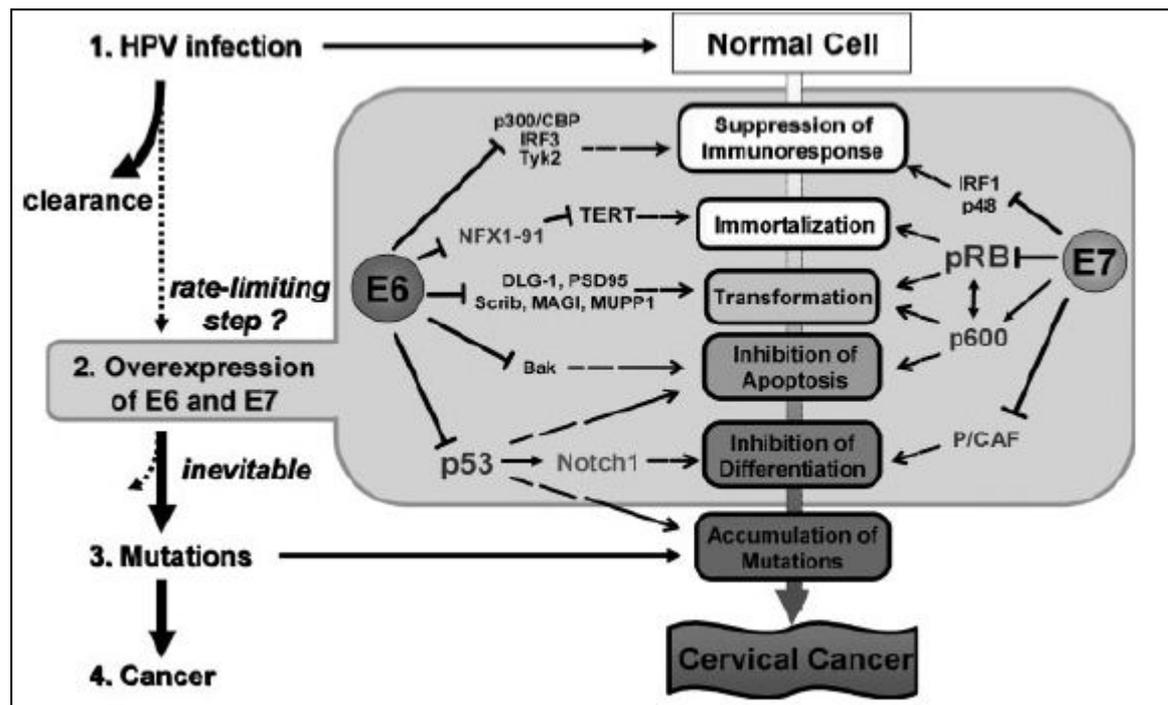
Критические этапы НРVs - индуцированного канцерогенеза



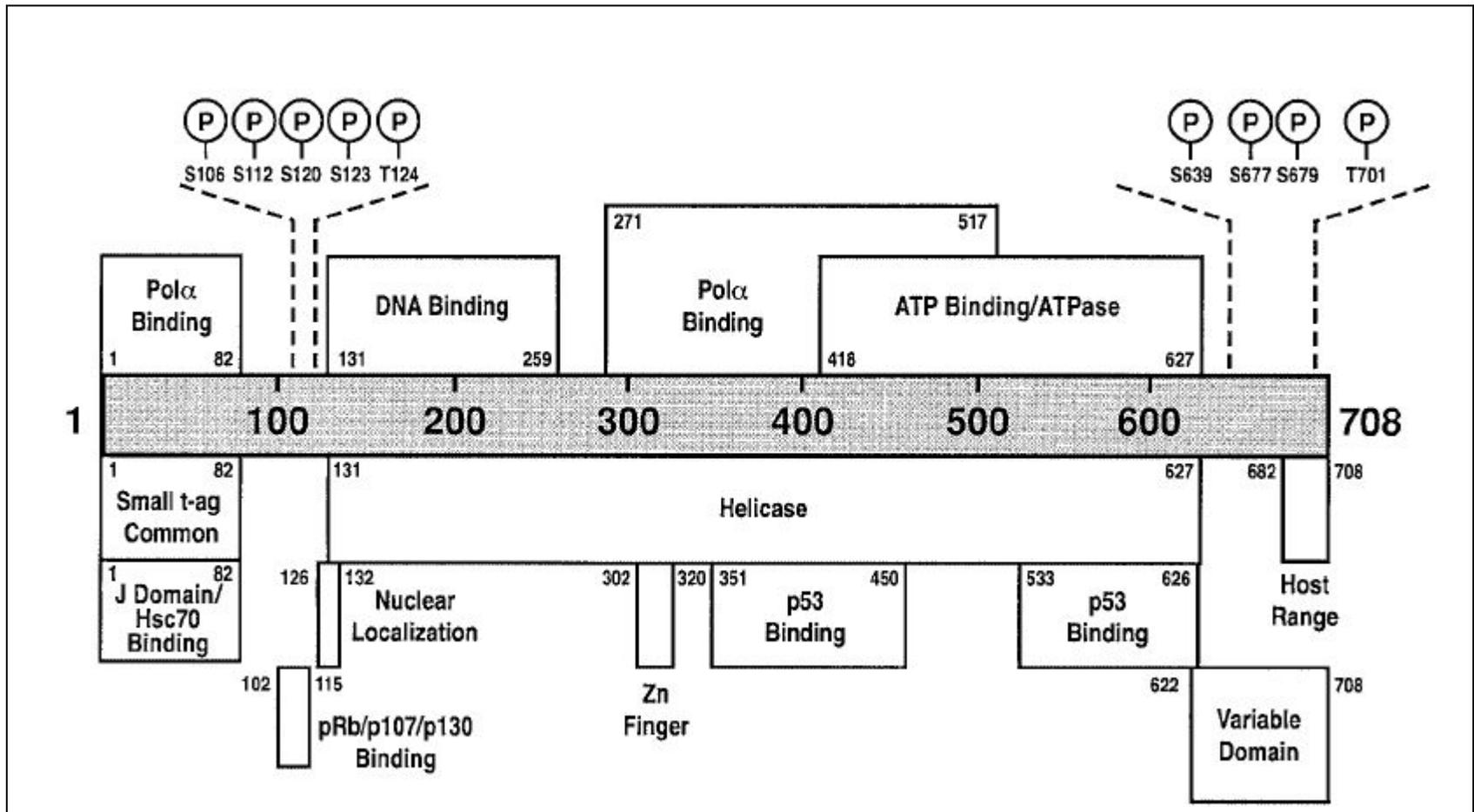
The HPV-16 E7 oncoprotein contributes to induction of genomic instability by induction of centrosome duplication errors. Shown are examples of different mitotic abnormalities that can be generated by numerical centrosome abnormalities. (A) Normal bipolar metaphase; each mitotic spindle pole body consists of a single centrosome which contains two centrioles. Individual centrioles are visualized by green fluorescent protein (GFP)-centrin fluorescence. (B) Abnormal bipolar mitosis due to centrosome aggregation. Individual centrioles are visualized by GFP-centrin fluorescence. The mitotic spindle pole on the left contains three centrioles, whereas the one on right contains four centrioles that may represent two aggregated centrosomes. There is a chance for nonsymmetrical chromosome segregation upon completion of cell division. (C) Abnormal bipolar mitosis in the presence of multiple individual centrosomes. Individual centrioles are visualized by immunofluorescence by using a centrin-specific antibody. While the majority of the chromosomes are segregated in a bipolar fashion, the centrosomes on the left may interfere with symmetrical chromosome distribution by apparently capturing some chromosomal material. (D) Predominantly monopolar mitosis in the presence of multiple centrosomes. Individual centrosomes are visualized by immunofluorescence by using a γ -tubulin-specific antibody. (E) Tripolar mitotic figures are hallmarks of high-risk HPV-associated cervical lesions. Individual centrosomes are visualized by GFP- γ -tubulin fluorescence.



Многостадийный механизм HPV-индуцированного канцерогенеза



Функциональные домены Т-антигена вируса SV 40



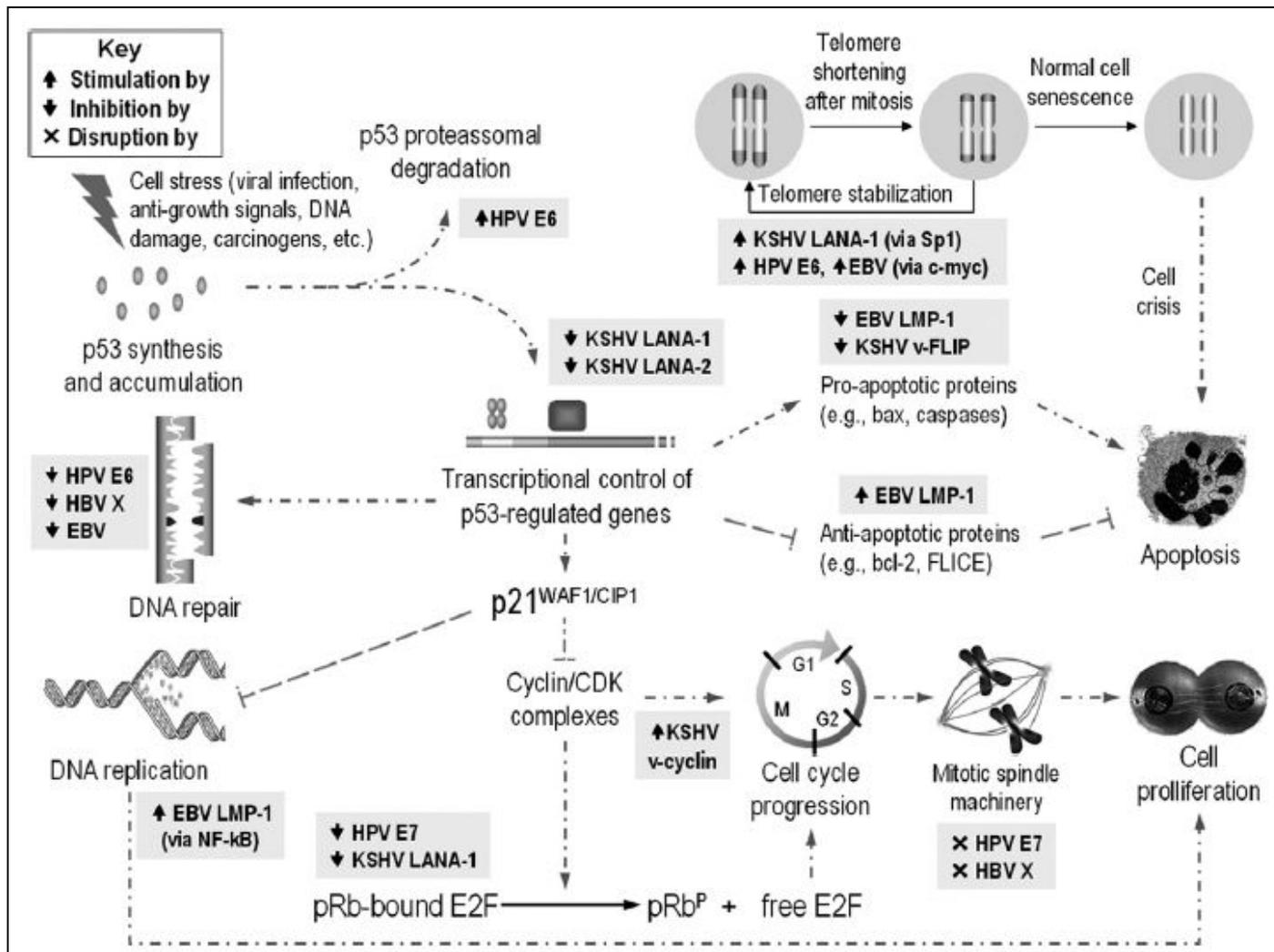
ДНК-вирусы, вызывающие рак у человека (1)

Virus family	Causal role in human cancer		Animal models
	Accepted	Potential	
Hepadnaviridae	HBV		WHV, GSHV
Herpesviridae			
Gammaherpesviruses	EBV	HHV-8(KSHV)	HVS
Papovaviridae			
Papillomaviruses	HPV (high-risk types)	HPV (other types)	CRPV, BPV
Polyomaviruses		SV40, BKV, JCV	SV40, BKV, JCV, Py
Adenoviridae			Multiple serotypes
Poxviridae			
Molluscipoxvirus		MCV	
Leporipoxvirus			RFV
Retroviridae			
Simple			ALV/ASV, MLV/MSV, FeLV/FeSV, MMTV
Complex	HTLV-I	HIV	BLV
Flaviviridae	HCV		

ДНК-вирусы, вызывающие рак у человека (2)

Virus	Viral taxonomy	Discovery	Genome	Associated human cancers
Hepatitis B virus	<i>Hepadnaviridae</i>	1967	dsDNA (partial) 3.2 kb, 4 genes	Hepatocellular carcinoma
Human papillomavirus	<i>Papillomaviridae</i>	1983	DsDNA 8 kb	Squamous cell carcinomas in anogenital and head and neck sites
Epstein–Barr virus/ human herpesvirus 4	<i>Herpesviridae</i> (gammaherpesvirus; lymphocryptovirus)	1964	DsDNA 172 kb, ≈90 genes	Burkitt lymphoma, undifferentiated nasopharyngeal carcinoma, Hodgkin lymphoma, non-Hodgkin lymphoma in immunosuppressed patients
Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8	<i>Herpesviridae</i> (gammaherpesvirus; radnovirus)	1994	DsDNA 165kb, ≈90 genes	Kaposi sarcoma, primary effusion lymphoma,

Разнообразные механизмы действия ДНК-онковирусов



Мишени для ДНК-онковирусов

Virus	Viral oncoproteins	Cellular targets ^a
SV40	Large T-antigen Small t-antigen	p53, pRb PP2A
HPV	E6 E7	p53 via E6AP, DLG, MAGI-1, MUPP1 pRb
Adeno	E1A E1B-55K	pRb p53
Adeno 9	E4ORF1	DLG, MAGI-1, MUPP1
BPV	E5	PDGF β receptor
EBV	LMP1	TRAFs
HBV	HBx (?)	p53, DDB1
Polyoma	Large T-antigen Middle T-antigen Small t-antigen	pRb c-Src, PI3-K, PLC- γ , Shc PP2A

Свойства вирусов человека

Characteristic	HBV	EBV	HPV	HTLV-I	HCV	HHV-8 (KSHV)	SV40	MCV
Genome								
Nucleic acid	dsDNA ^a	dsDNA	dsDNA	ssRNA→dsDNA	ssRNA	dsDNA	dsDNA	dsDNA
Size (kb/kbp)	3.2	172	8	9.0	9.4	165	5.2	190
No. genes	4	≈90	8–10	6	9	≈90	6	≈180
Cell tropism	Hepatocytes, white blood cells	Oropharyngeal epithelial cells, B cells	Squamous epithelial cells (mucosal, cutaneous)	T cells	Hepatocytes	Vascular endothelial cells, lymphocytes	Kidney epithelial cells, others	Epidermal cells
Unique biology	May cause chronic infection and inflammation	Immortalizes B cells	Highly species and tissue specific, replication dependent on cell differentiation	Immortalizes T cells, encodes trans-acting factor	High rate of chronic infection and inflammation	Contains many cellular genes	Stimulates cell DNA synthesis	Species and tissue specific
Prevalence of infection	Chronic infections common – Asia, Africa	Common	Common	Common – Japan, Caribbean	Common	Not ubiquitous		
Transmission	Vertical, parenteral, horizontal, venereal	Saliva	Venereal, skin abrasions	Breast milk, parenteral, venereal	Parenteral, horizontal	Horizontal, venereal	Urine?	Contact, venereal
Human diseases	Hepatitis, cirrhosis	IM, oral hairy leukoplakia	Skin warts, EV, genital warts, LP	HAM/TSP	Hepatitis, cirrhosis			
Human cancers	HCC	BL, ^b NPC, ^c HD, lymphomas	Cervical, skin, oropharynx	ATL	HCC	KS, PEL, Castleman's disease	Brain, bone, mesothelioma	MC
Transforming genes	HBx ?	LMP-1	E6, E7	Tax ?	NS3?		Large T-antigen, small t-antigen	
Viral genome integrated in human tumors	Usually		Usually	Yes (provirus)	No			No

Новые онковirusы

- Новое исследование указывает на то, что белок синтезируемый вирусом, вызывающим рак, играет важнейшую роль в инициации размножения вируса, сообщает Researchnews.osu.edu.
- Исследователи проанализировали Т-лимфотропический вирус человека типа 1 (HTLV-1) и белок, продуцируемый им и названный p13, ранее считавшийся незначительным для размножения вируса. Вирус HTLV-1 распространяется путем подавления нормальных Т-клеток (один из видов иммунных клеток), не нуждаясь при этом в выделении вирусных частиц. Белок p13 — один из вспомогательных белков, последние эксперименты показали, что он незаменим при инфицировании человеческих клеток, а также для размножения вируса.
- "Необходимо понять функции этих вспомогательных молекул, чтобы разрабатывать новые вакцины для предотвращения инфекций, которые могут стать причиной злокачественных опухолей", — считает автор исследования, профессор Майкл Лэрмор.
- Изучение этого белка особенно важно, потому что он способен мигрировать к митохондриям (энергетические "подстанции" клетки) и вызывать путём воздействия на них клеточную смерть. Ежегодно HTLV-1 инфицирует от 15 до 20 миллионов человек, 5 % из которых заболевают Т-клеточной лейкемией или лимфомой.

Основные принципы вирусного онкогенеза

- **Вирусы могут вызывать рак у животных и человека**
- **Онковирусы часто вызывают продолжительную инфекцию у естественного хозяина**
- **Факторы хозяина – важнейшие детерминанты в вирусном канцерогенезе**
- **Вирусные инфекции – встречаются чаще, чем образование опухолей**
- **Длинный латентный период обычно тянется между началом инфекции и появлением опухоли**
- **Вирусные линии могут отличаться по онкогенному потенциалу**
- **Вирусы действуют как прямые, так и непрямые канцерогенные агенты**
- **Онкогенные вирусы изменяют клеточный рост**
- **Модели на животных могут выявить механизм действия вирусов**
- **Вирусные маркеры обычно присутствуют в опухолевых клетках**
- **Один вирус может быть ассоциирован с более, чем один тип опухоли**

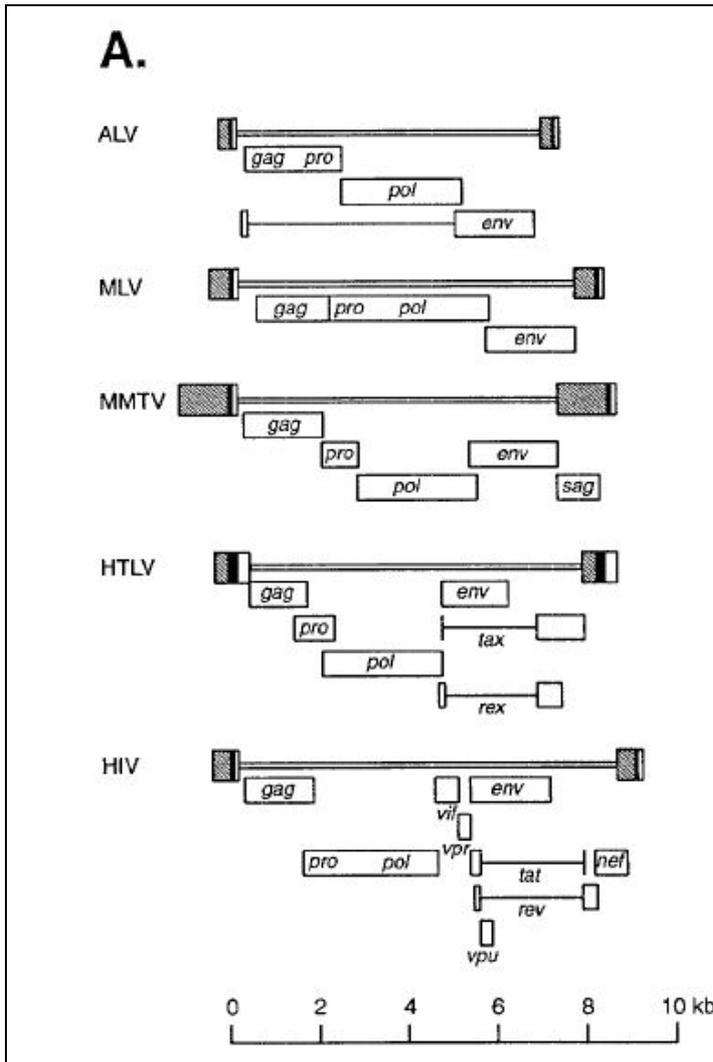
Ретровирусы

Репликационный цикл ретровирусов



1. RV связывается с рецептором на клеточной поверхности.
2. Входит в клетку и ревертирует РНК в 2-х цепочечную ДНК.
3. Вирусная ДНК интегрируется в хромосому хозяина
4. Формируется провирус.
5. В клетке синтезируется РНК и транслируются вирусные белки.
6. Формируются новые вирусы, которые выходят из клетки

Генетическая организация некоторых ретровирусов

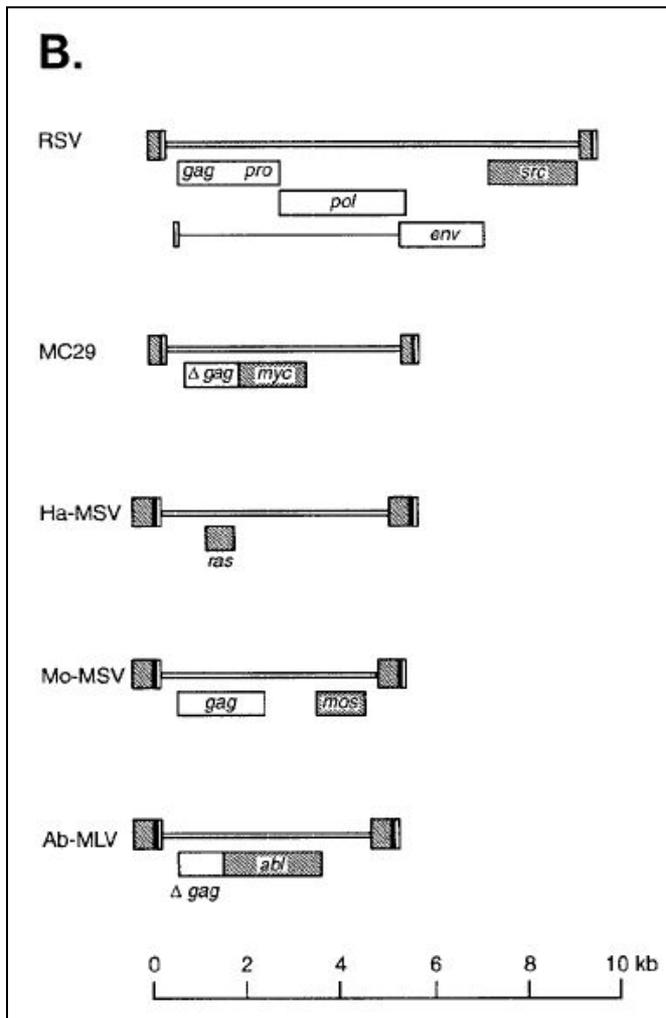


A. «Недефективные» репликационно-компетентные вирусы .

Показаны вирусы с простым или сложным геномом. ALV- вирус лейкоза птиц, MLV - вирус лейкоза мышей, MMTV- мышинный вирус РМЖ.

Сложные вирусы: HTLV – вирус Т-клеточной лейкемии человека, HIV – вирус иммунодефицита человека.

Генетическая организация некоторых ретровирусов



В. Вирусы, несущие онкогены. Все дефективные, исключая RSV (вирус саркомы Рауша).

MC-29 – вирус миелоцитоматоза птиц

Ha-MSV – вирус мышинной саркомы Харви

MSV – вирус мышинной саркомы Молони

Ab-MLV – вирус лейкемии мышей Абельсона

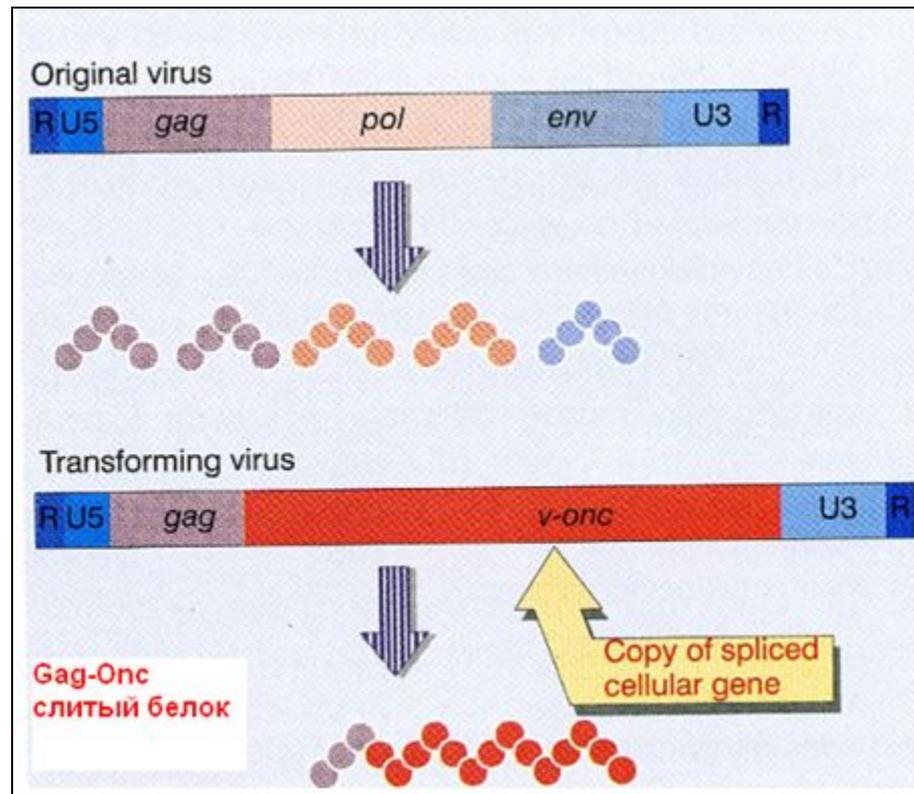
Ретровирусы, не несущие клеточные гены, но их активирующие

General class	Oncogene	Virus			Protein product
		Name	Abbreviation	Origin	
Non-receptor protein tyrosine kinase	<i>Lck</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Mouse	Tyrosine kinase
Receptor protein tyrosine kinase	<i>c-erbB</i>	Rous-associated virus 1	RAV-1	Chicken	Epidermal growth factor receptor
	<i>c-fms</i>	Friend murine leukemia virus	Fr-MLV	Mouse	Colony stimulating factor receptor
Serine/threonine protein kinase	<i>Pim1</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Mouse	Serine/threonine kinase
Growth factor	<i>Fgf3/Int2</i>	Mouse mammary tumor virus	MMTV	Mouse	Fibroblast growth factor
	<i>Wnt1/Int1</i>	Mouse mammary tumor virus	MMTV	Mouse	Secreted glycoprotein
	<i>Wnt3/Int4</i>	Mouse mammary tumor virus	MMTV	Mouse	Secreted glycoprotein
G protein	<i>c-Ki-ras</i>	Friend murine leukemia virus	Fr-MLV	Mouse	GDP/GTP binding
Transcription factor	<i>Ets1</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Rat	Transcription factor
	<i>c-fos</i>	Rous-associated virus 1	RAV-1	Chicken	Transcription factor (AP1 component)
	<i>c-myb</i>	Rous-associated virus 1	RAV-1	Chicken	Transcription factor
	<i>c-myb</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Mouse	Transcription factor
	<i>c-myc</i>	Rous-associated virus 1	RAV-1	Chicken	Transcription factor
	<i>c-myc</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Mouse	Transcription factor
Cyclin	<i>Fis1/Cyclin D1</i>	Friend murine leukemia virus	Fr-MLV	Mouse	G ₁ cyclin
	<i>Vin1/Cyclin D2</i>	Moloney murine leukemia virus	Mo-MLV	Mouse	G ₁ cyclin

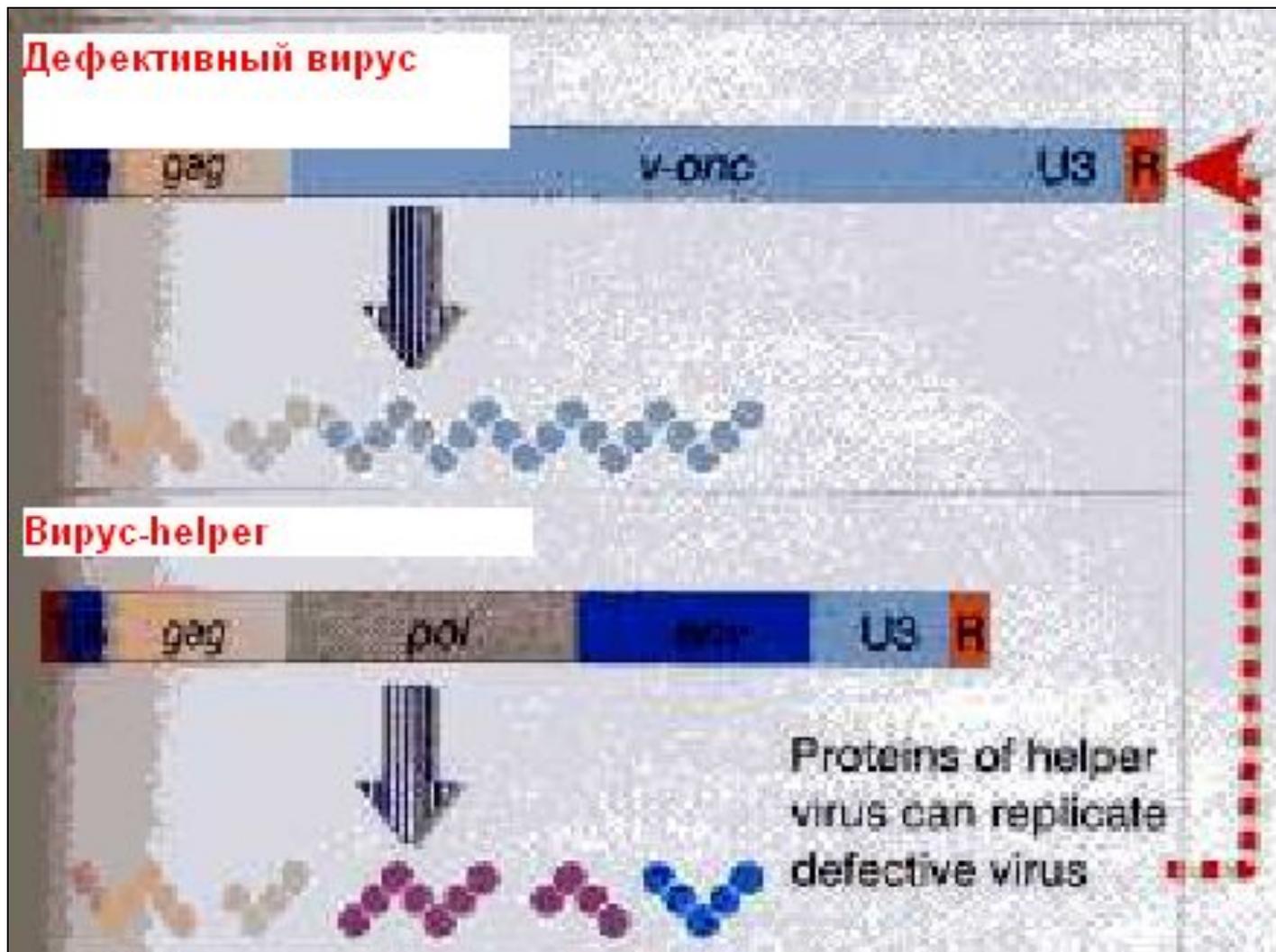
Ретровирусы, содержащие клеточные онкогены

General class	Oncogene	Virus			Protein product
		Name	Abbreviation	Origin	
Non-receptor protein tyrosine kinase	<i>abl</i>	Abelson murine leukemia virus	Ab-MLV	Mouse	Tyrosine kinase
	<i>fes</i>	ST feline sarcoma virus	ST-FeSV	Cat	Tyrosine kinase
	<i>fps</i>	Fujinami sarcoma virus	FuSV	Chicken	Tyrosine kinase
	<i>src</i>	Rous sarcoma virus	RSV	Chicken	Tyrosine kinase
Receptor protein tyrosine kinase	<i>erbB</i>	Avian erythroblastosis virus	AEV-ES4	Chicken	Epidermal growth factor receptor
	<i>fms</i>	McDonough feline sarcoma virus	SM-FeSV	Cat	Colony-stimulating factor receptor
	<i>kit</i>	Hardy-Zuckerman-4 feline sarcoma virus	HZ4-FeSV	Cat	Stem cell factor receptor
Serine/threonine protein kinase	<i>mil</i>	Avian myelocytoma virus	MH2	Chicken	Serine/threonine kinase
	<i>mos</i>	Moloney murine sarcoma virus	Mo-MSV	Mouse	Serine/threonine kinase
	<i>raf</i>	Murine sarcoma virus 3611	MSV3611	Mouse	Serine/threonine kinase
Growth factor G protein	<i>sis</i>	Simian sarcoma virus	SSV	Monkey	Platelet-derived growth factor
	<i>H-ras</i>	Harvey murine sarcoma virus	Ha-MSV	Rat	GDP/GTP binding
Transcription factor	<i>K-ras</i>	Kirsten murine sarcoma virus	Ki-MSV	Rat	GDP/GTP binding
	<i>erbA</i>	Avian erythroblastosis virus	AEV-ES4	Chicken	Transcription factor (thyroid hormone receptor)
	<i>ets</i>	Avian myeloblastosis virus E26	AMV-E26	Chicken	Transcription factor
	<i>fos</i>	FBJ osteosarcoma virus	FBJ-MSV	Mouse	Transcription factor (AP1 component)
	<i>jun</i>	Avian sarcoma virus-17	ASV-17	Chicken	Transcription factor (AP1 component)
	<i>myb</i>	Avian myeloblastosis virus	AMV	Chicken	Transcription factor
	<i>myc</i>	MC29 myelocytoma virus	MC29	Chicken	Transcription factor
Adapter protein	<i>rel</i>	Reticuloendotheliosis virus	REV-T	Turkey	Transcription factor (NF-κB family)
	<i>crk</i>	CT10 avian sarcoma virus	CT-10	Chicken	

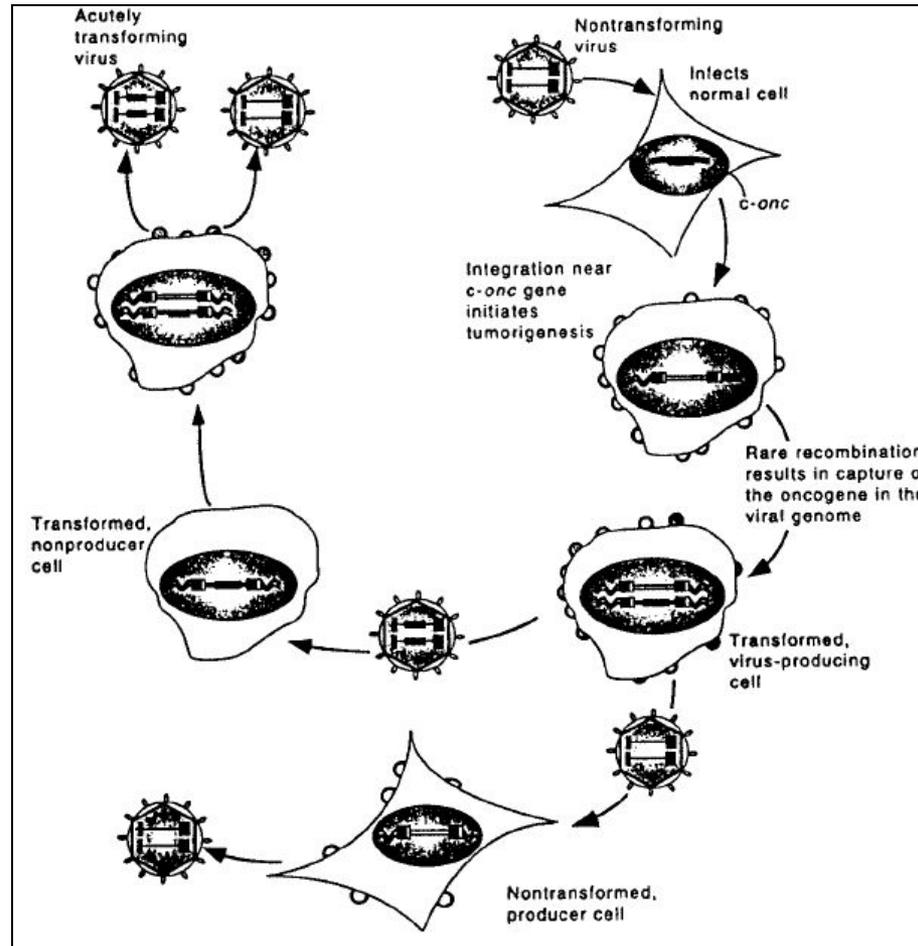
Трансформирующий вирус несет копию гена хозяина



Трансформирующий ретровирус



Ретровирусная трансформация



Механизмы активации прото-онкогенов (ПО)

Трансформирующая «сила» ПО может характеризоваться появлением фокусов.
Тестируемая культура – 3Т3- мышинные фибробласты.

Высокоэффективные гены – индуцируют более 100 фокусов/нг ДНК/1000000 клеток.
Низкоэффективные – менее 10.

Мутация в 12-м и 61-м кодоне c-ras делает этот ген высокоэффективным.

Вставки, транслокация или амплификация могут активировать ПО

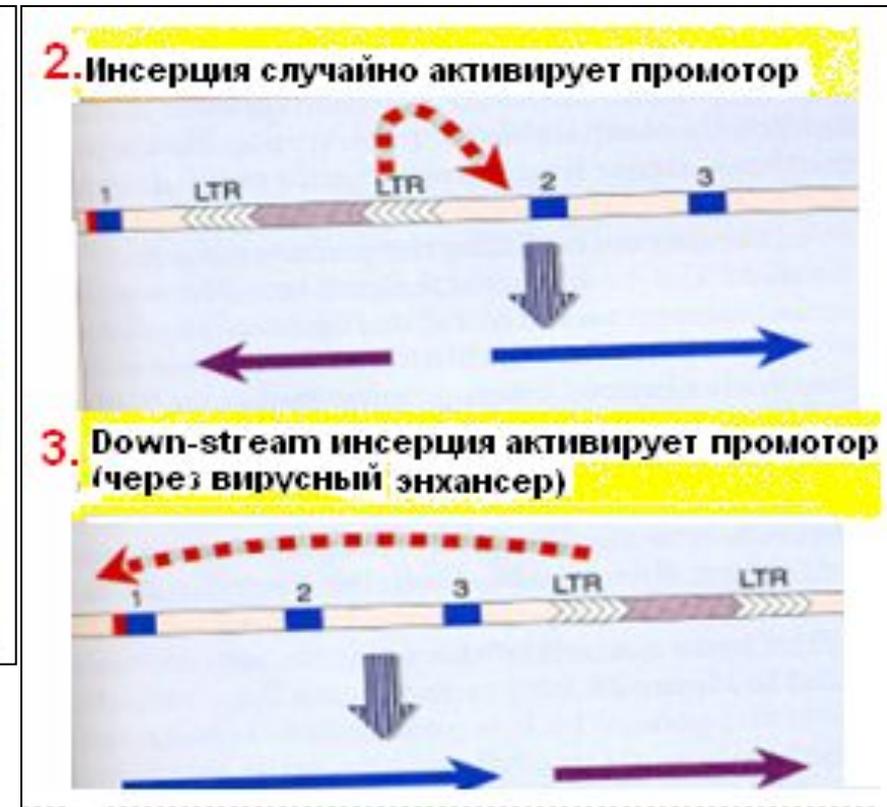
В случае вставки или транслокации существуют доказательства, что эти изменения в геноме являются причиной трансформации.

В последнее время получено доказательство, что амплификация также содействует этому (на примере Her2/Neu).

Есть примеры, когда встраивание вируса в геном (близко к с-тус) приводит к трансформации

Во всех случаях кодирующая последовательность этого гена не изменяется, а онкогенные свойства появляются из-за потери контроля регуляции экспрессии

Варианты активации с-туса



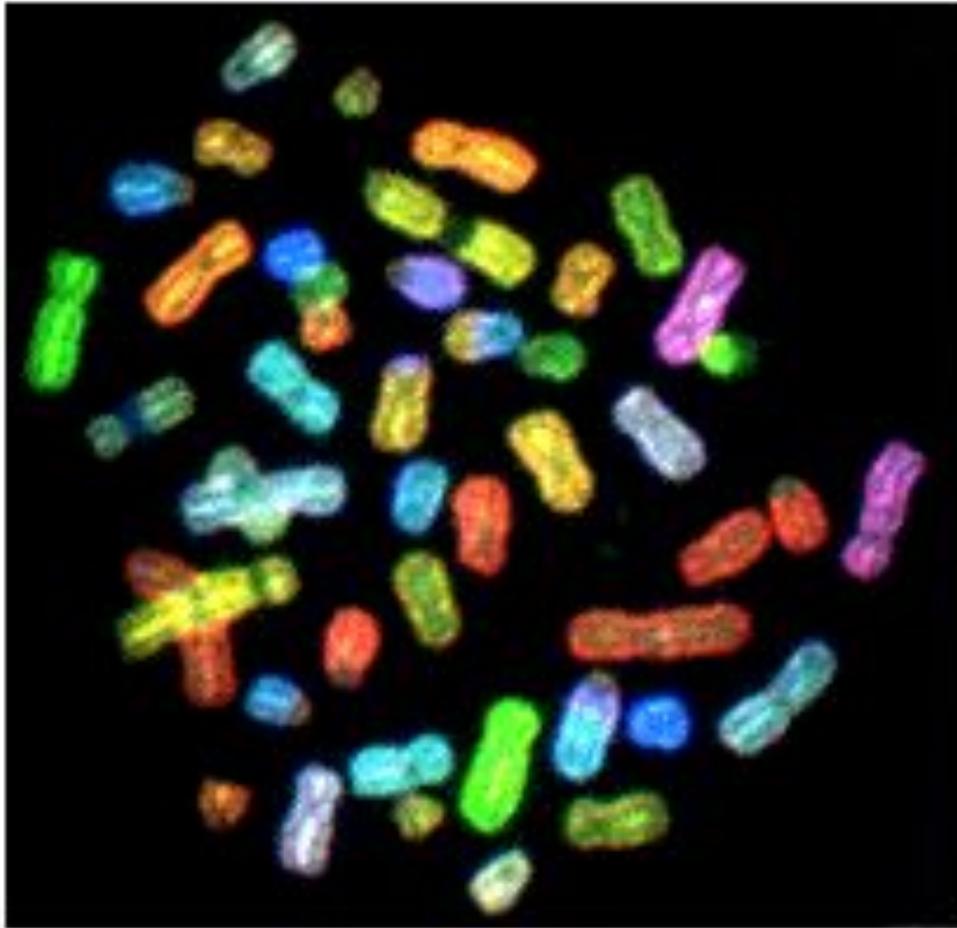
Другие ПО, активируемые вставкой ретровируса

- c-erbB,
- c-myb,
- c-mos,
- c-H-ras,
- c-raf

Результаты транслокации

- Часть белка ПО может быть активирована независимо от другой части (с-тус).
- Другой партнер в гибридном гене может иметь позитивный эффект на ПО (Филадельфийская хромосома)

Хромосомы пациента с острой промиелоцитарной лейкемией (APL)



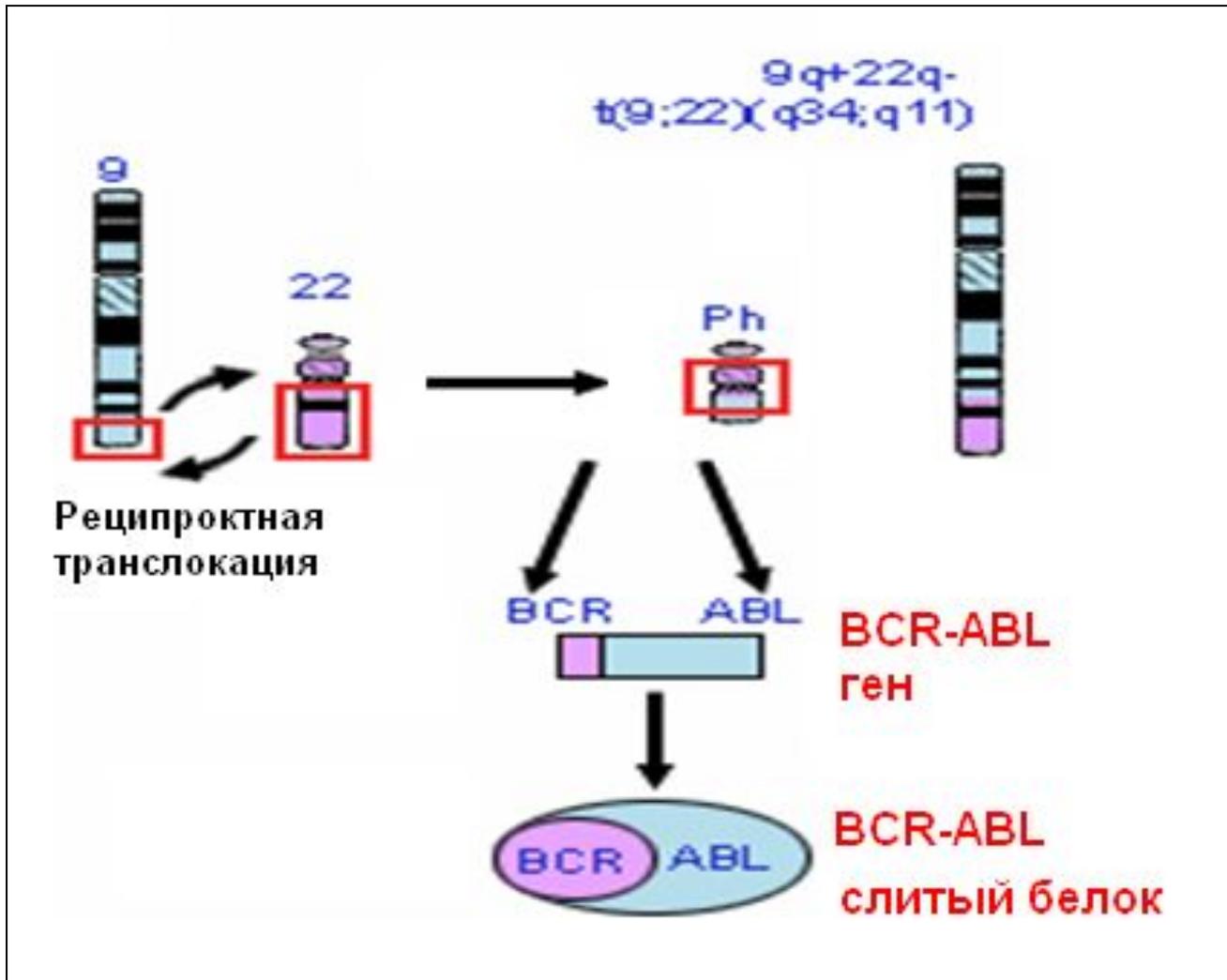
Видны следующие транслокации:

- между 7 и 15 хромосомами
- между 11, 15, 17 хромосомами
- между 9 и 18 хромосомами

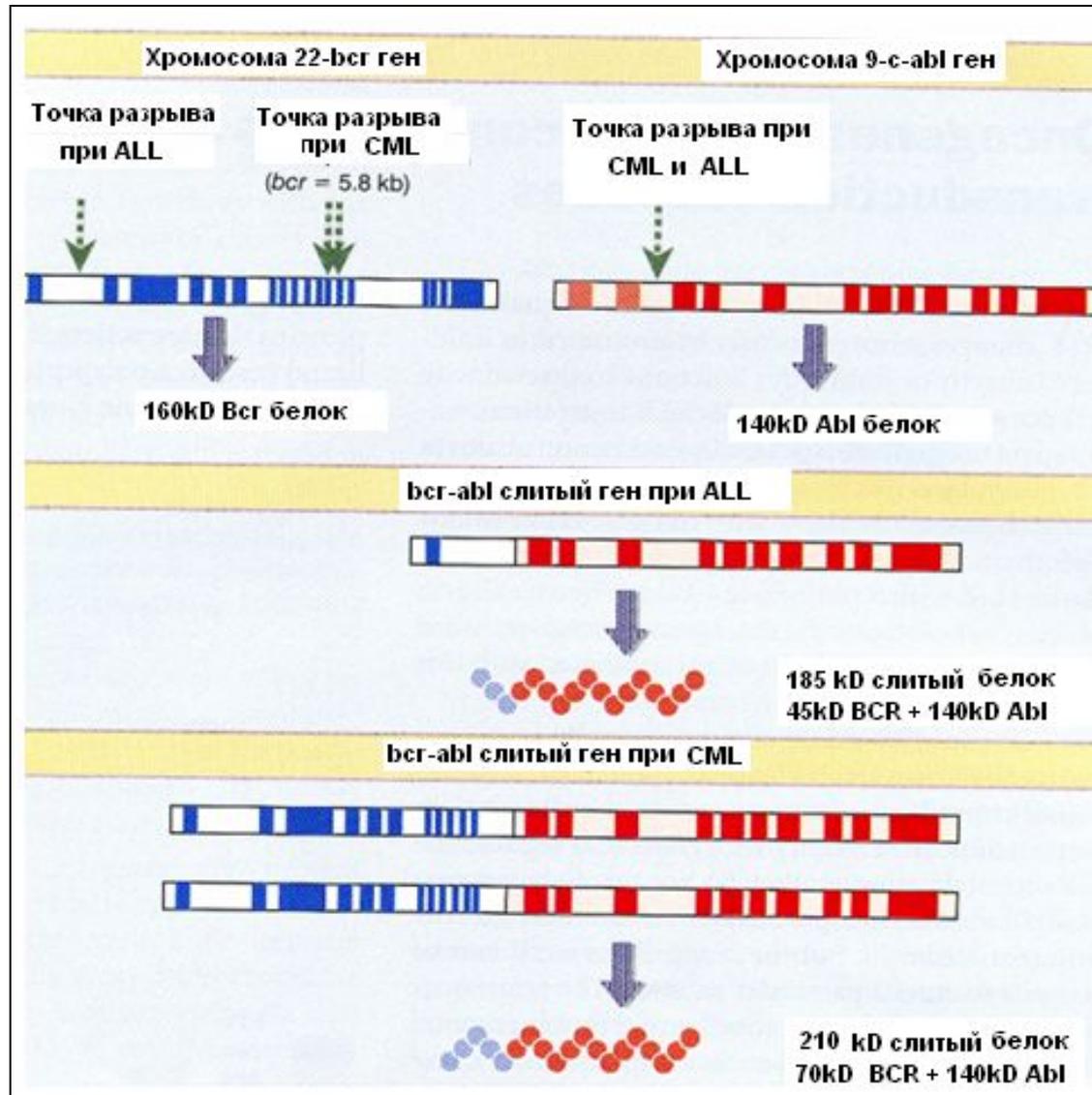
Филадельфийская хромосома (РН)

- Хроническая миелогенная лейкемия (СМЛ) – 5000kb конца 9-й хр. (c-abl) в 5,8kb 22-й хр. (bcr –break-point cluster region)- 2-й интрон
- Острая лимфобластная лейкемия (ALL) – точка разрыва в 1-м интроне
- Слитый белок активирует адапторы Ras белка Crb2 и Shc

Образование Филадельфийской хромосомы (СМЛ)



Варианты Ph хромосомы



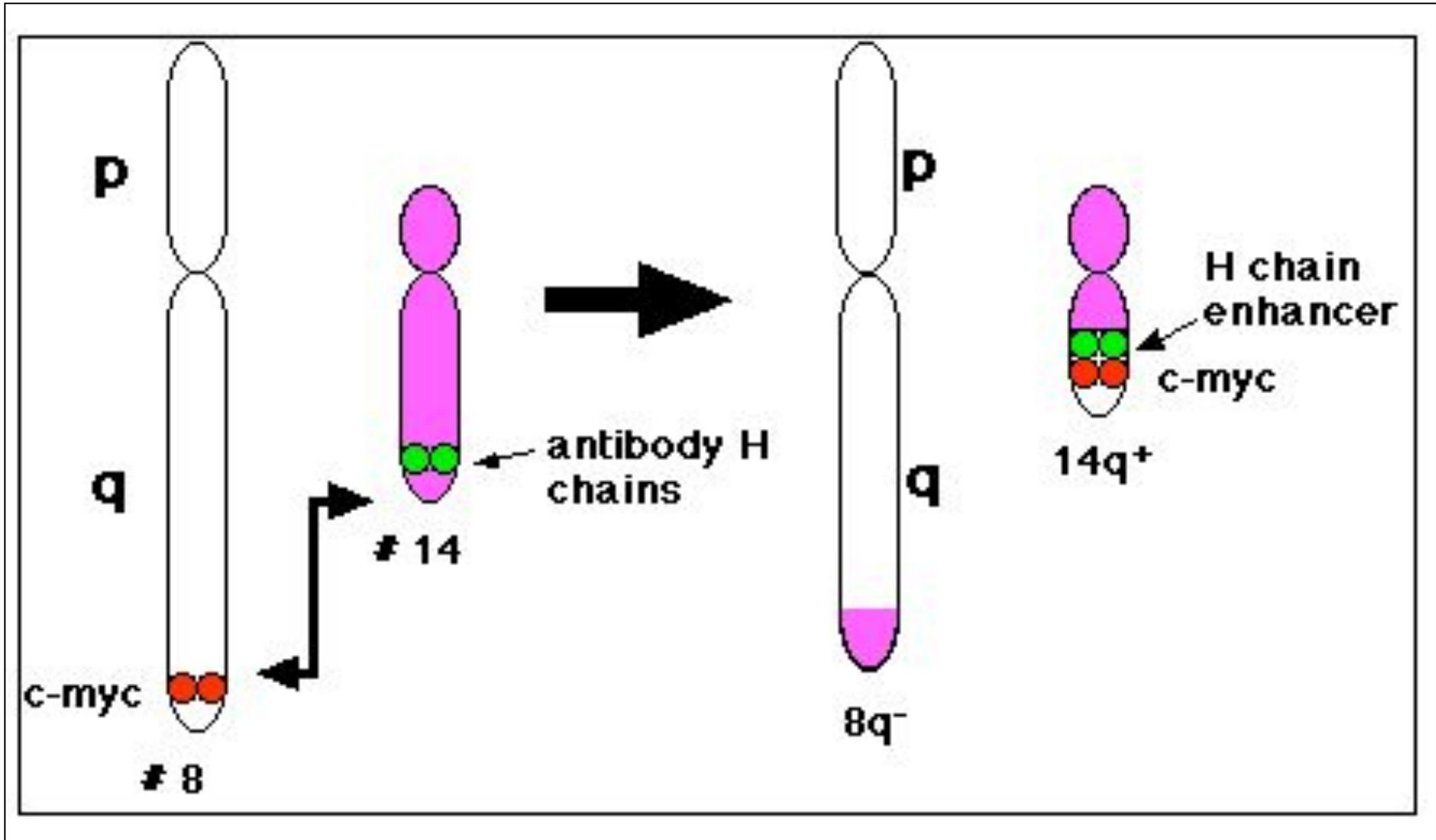
Лечение СМЛ

Стандартная терапия хронической миелоидной лейкемии – тирозинкиназный ингибитор иматиниб (imatinib).

Результат лечения - 81% 7-летней выживаемости.

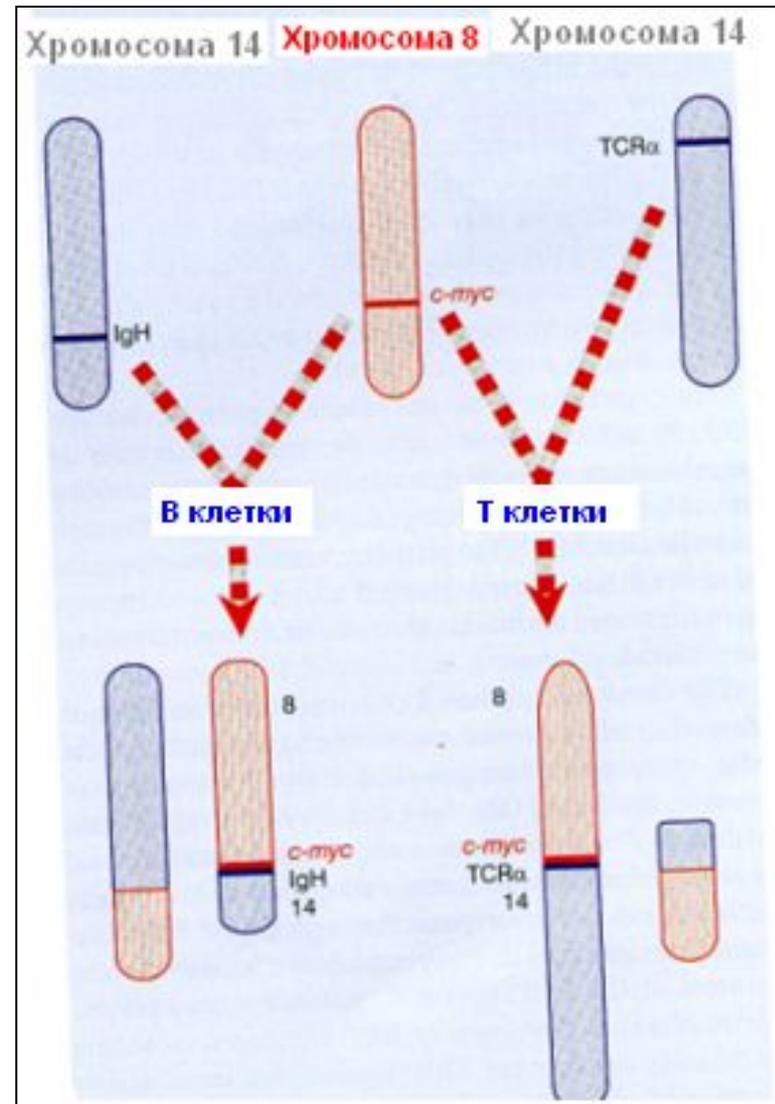
Dasatinib ингибитор 2-го поколения.

Лимфома Беркита

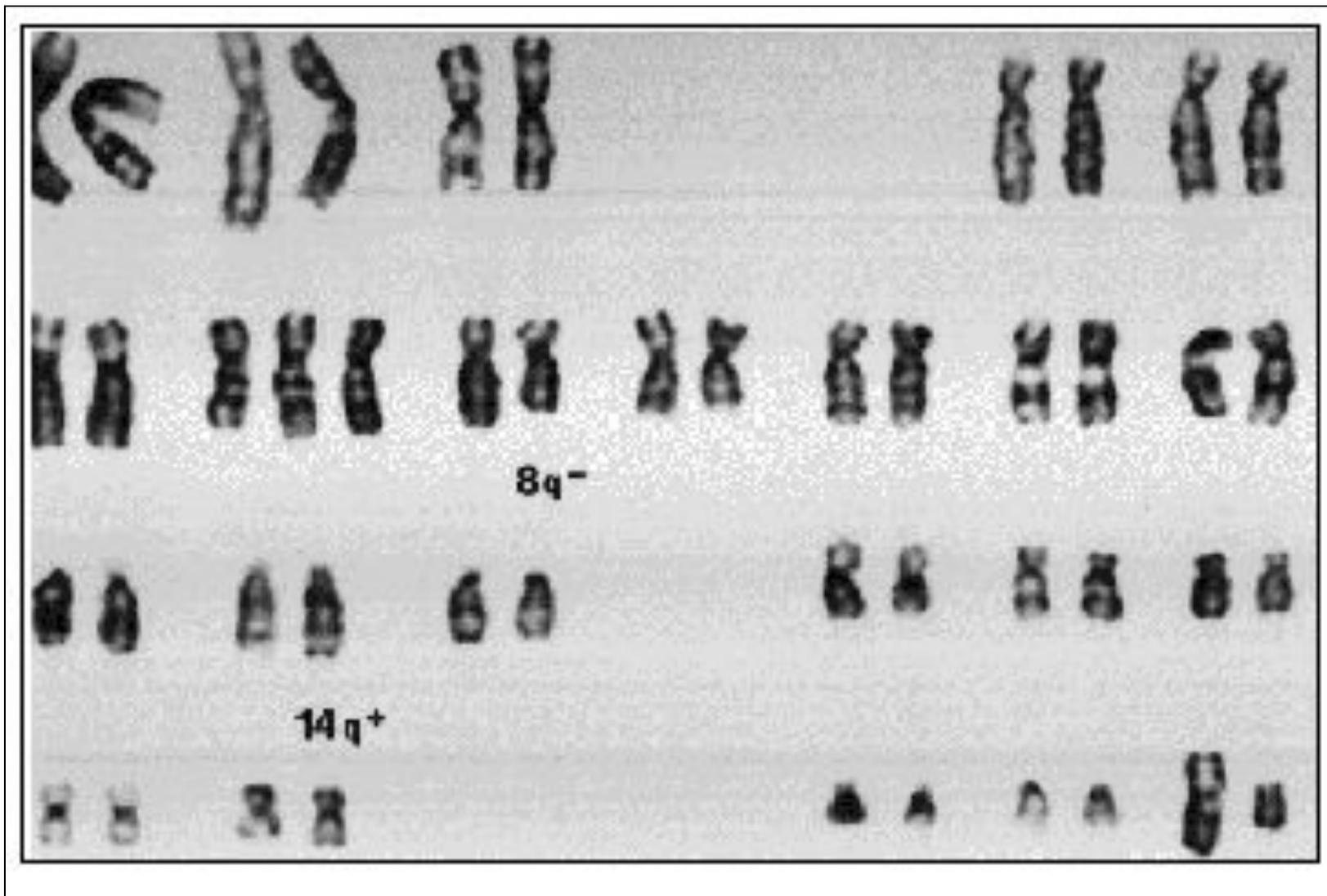


Варианты транслокаций

TCR - T-cell receptor
(14q11)



Кариотип лимфомы Беркита



Лимфома Беркита



Классификация лимфом

Aggressive B-cell lymphomas in the WHO Classification (2008)

Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified

Primary DLBCL of the CNS

Primary cutaneous DLBCL, leg type

T cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma

EBV⁺ DLBCL of the elderly*

DLBCL associated with chronic inflammation

Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma

Intravascular large B-cell lymphoma

ALK-positive large B-cell lymphoma

Plasmablastic lymphoma

Primary effusion lymphoma

Large B-cell lymphoma arising in HHV-8–associated multicentric

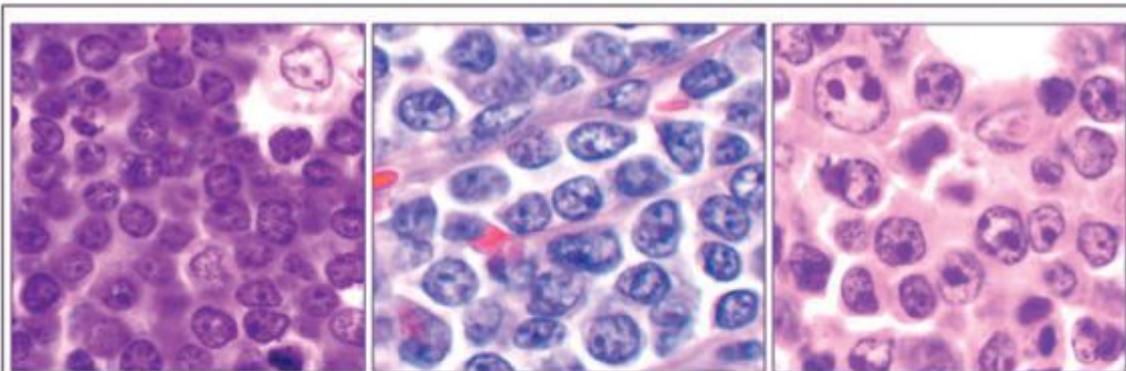
Castleman Disease

Burkitt lymphoma

B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between
diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma

B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between
diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma

Варианты транслокаций



Burkitt

CD10+
BCL6+
BCL2-
Sox 11 +/-
MIB-1 > 98%
MYC simple
EBV +/-

B-UNC/BL/DLBCL

CD10+
BCL6 +/-
BCL2+
Sox 11 ND
MIB-1 < 90%
MYC complex
EBV -

DLBCL GCB

CD10+
BCL6+
BCL2 +/-
Sox 11 -
MIB-1 Variable
MYC rare +
EBV -

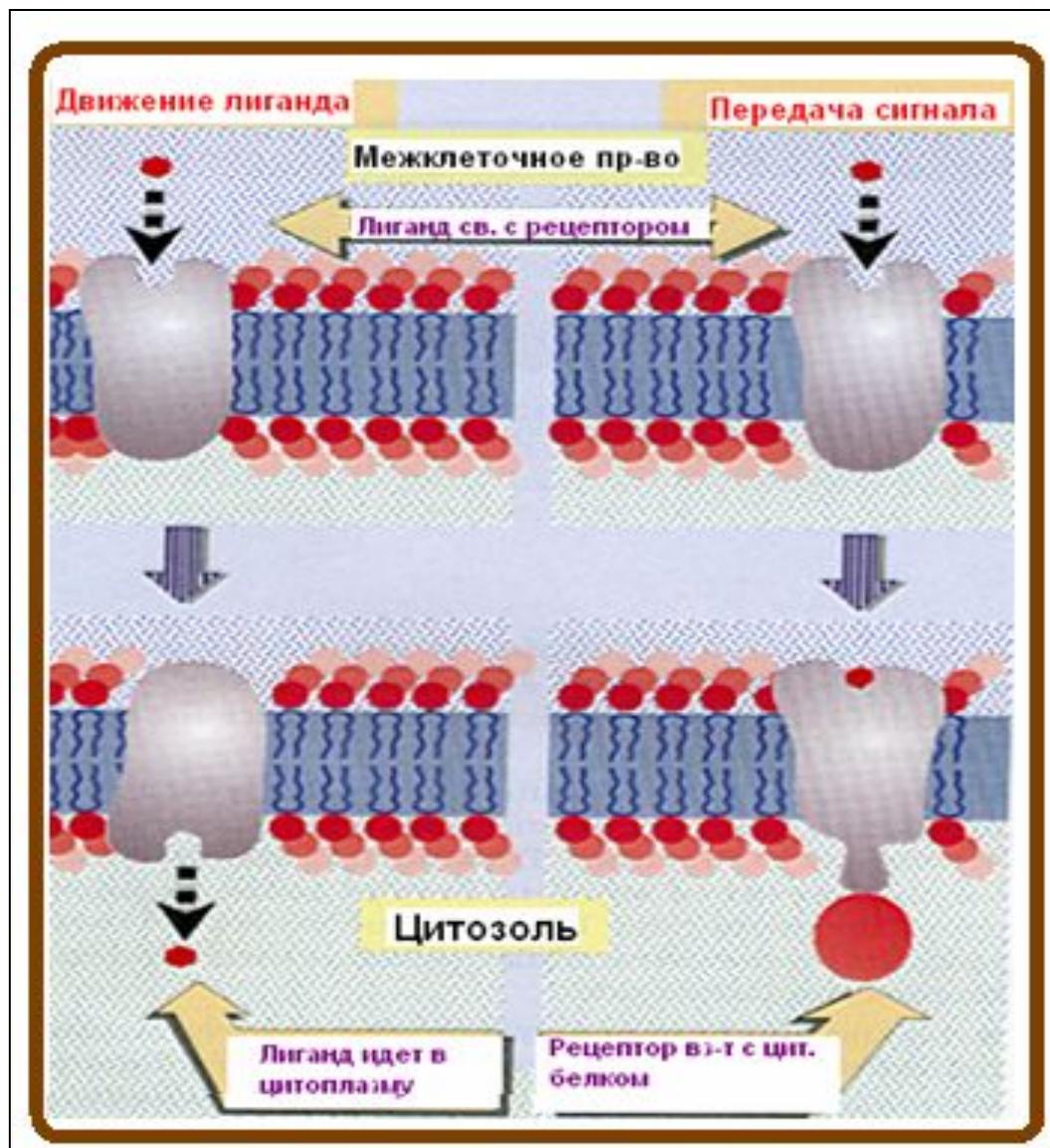
5.2.

Передача клеточного сигнала (Сигнальная трансдукция)

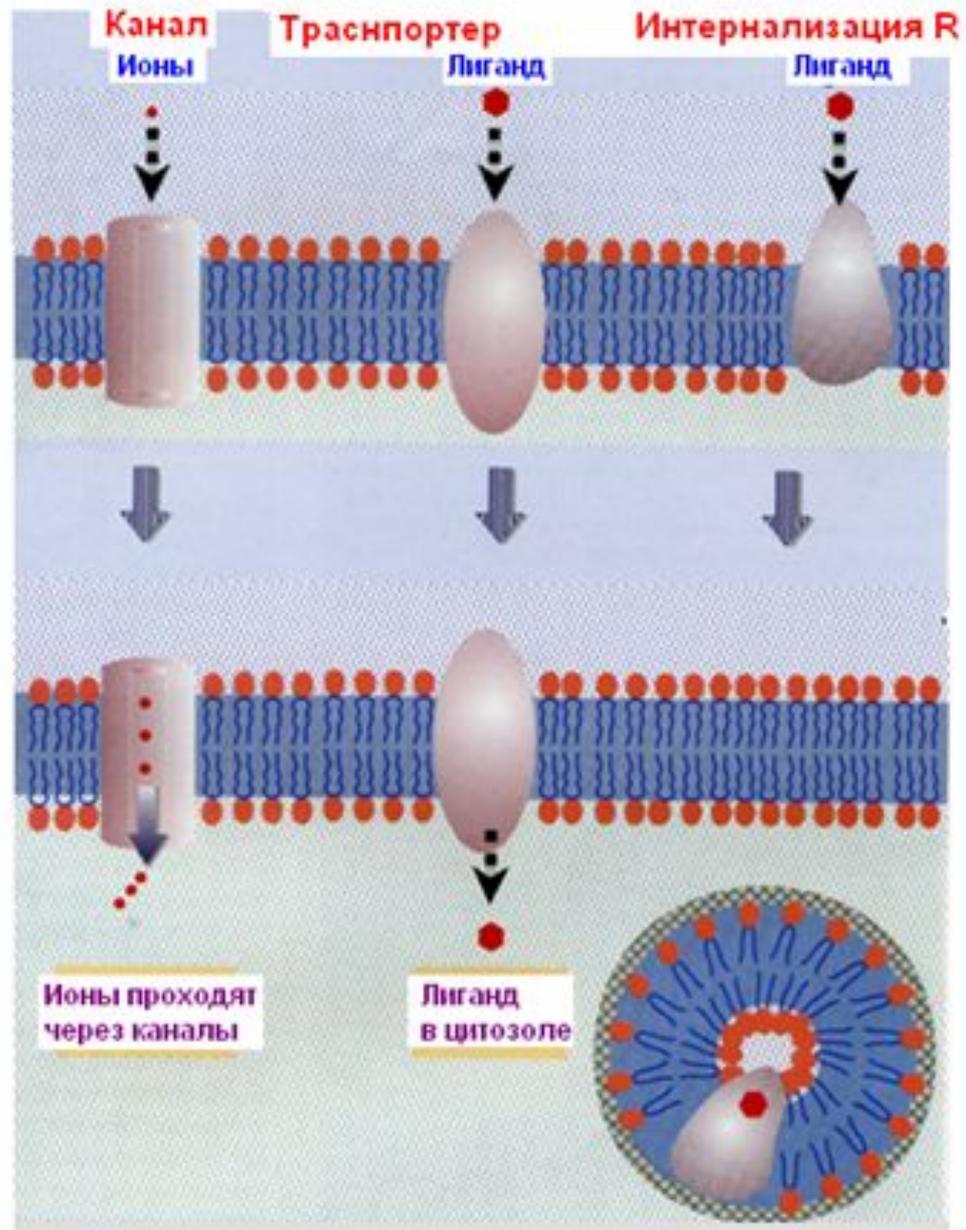
5.2.1.

**Факторы роста и их
рецепторы**

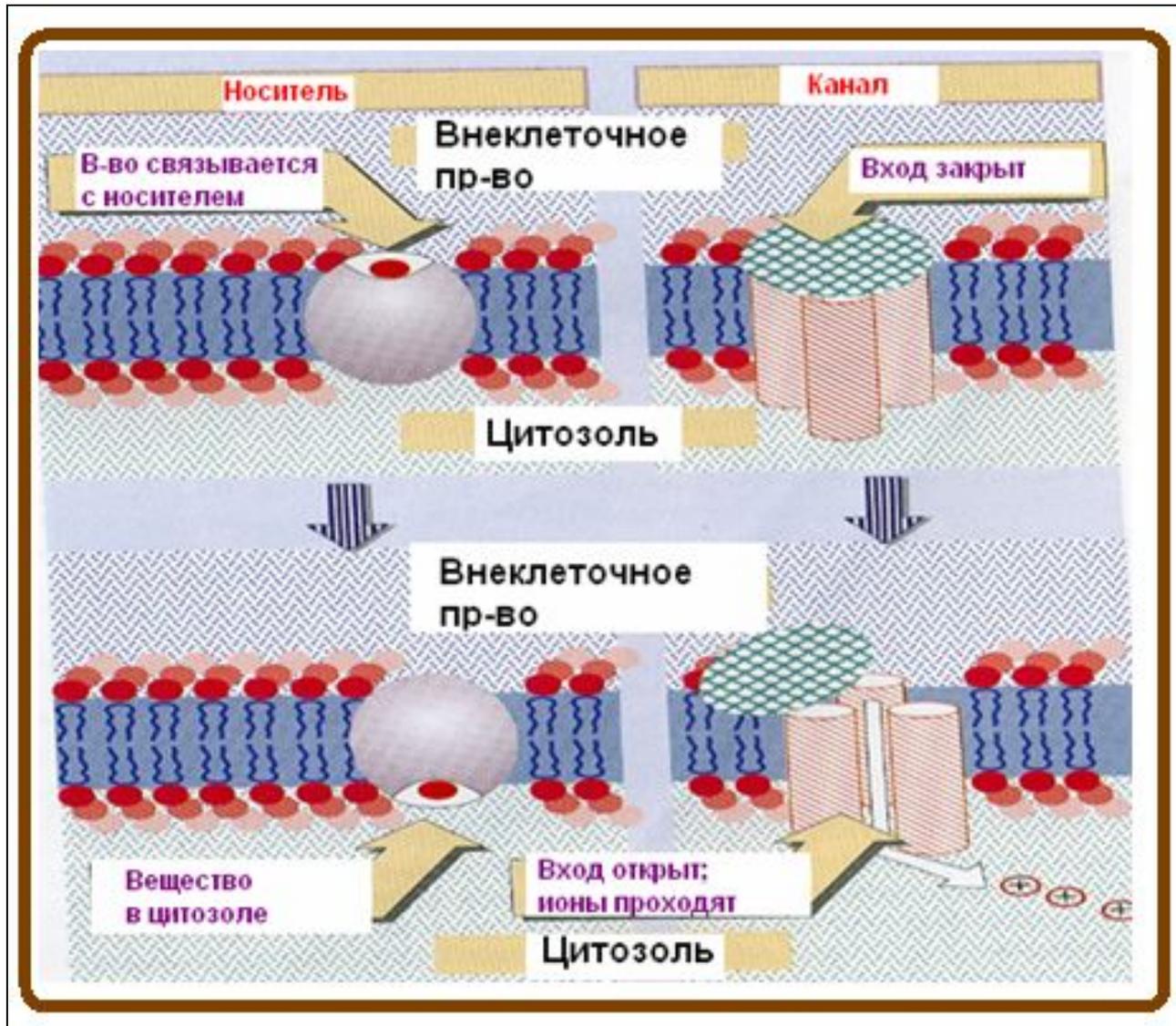
Прохождение сигнала



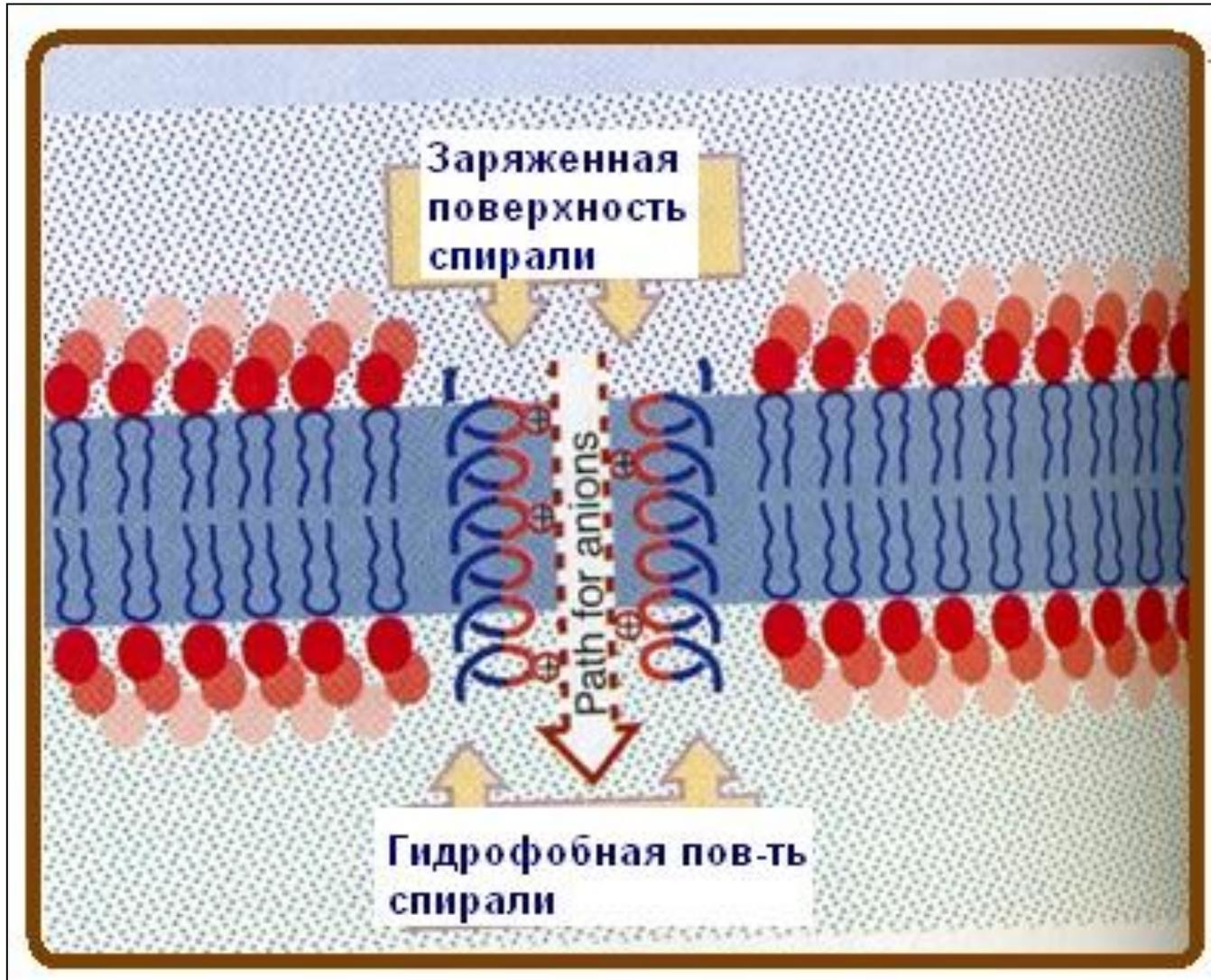
**3 способа
прохож-
дения
сигнала**



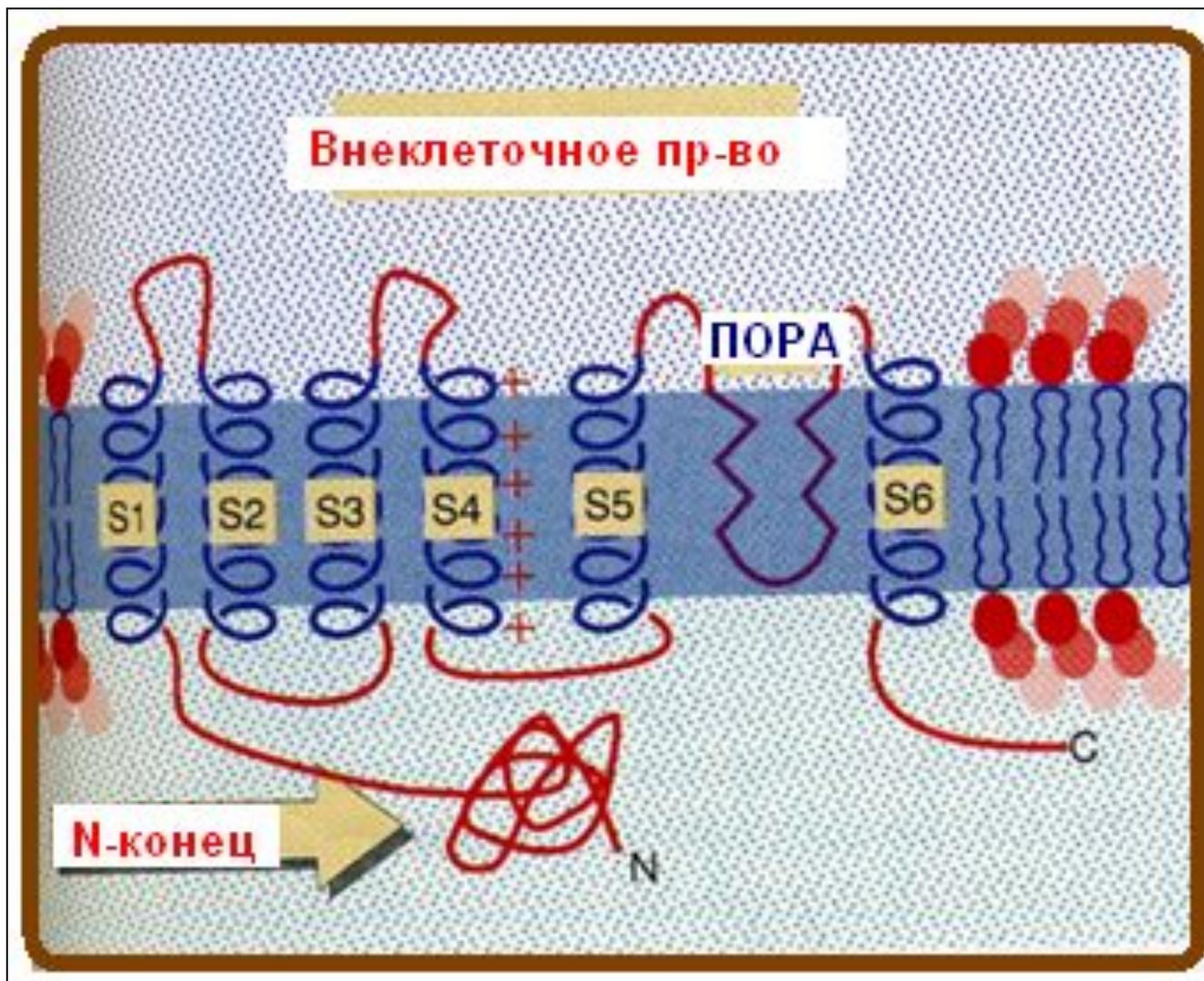
Способы прохождения сигнала



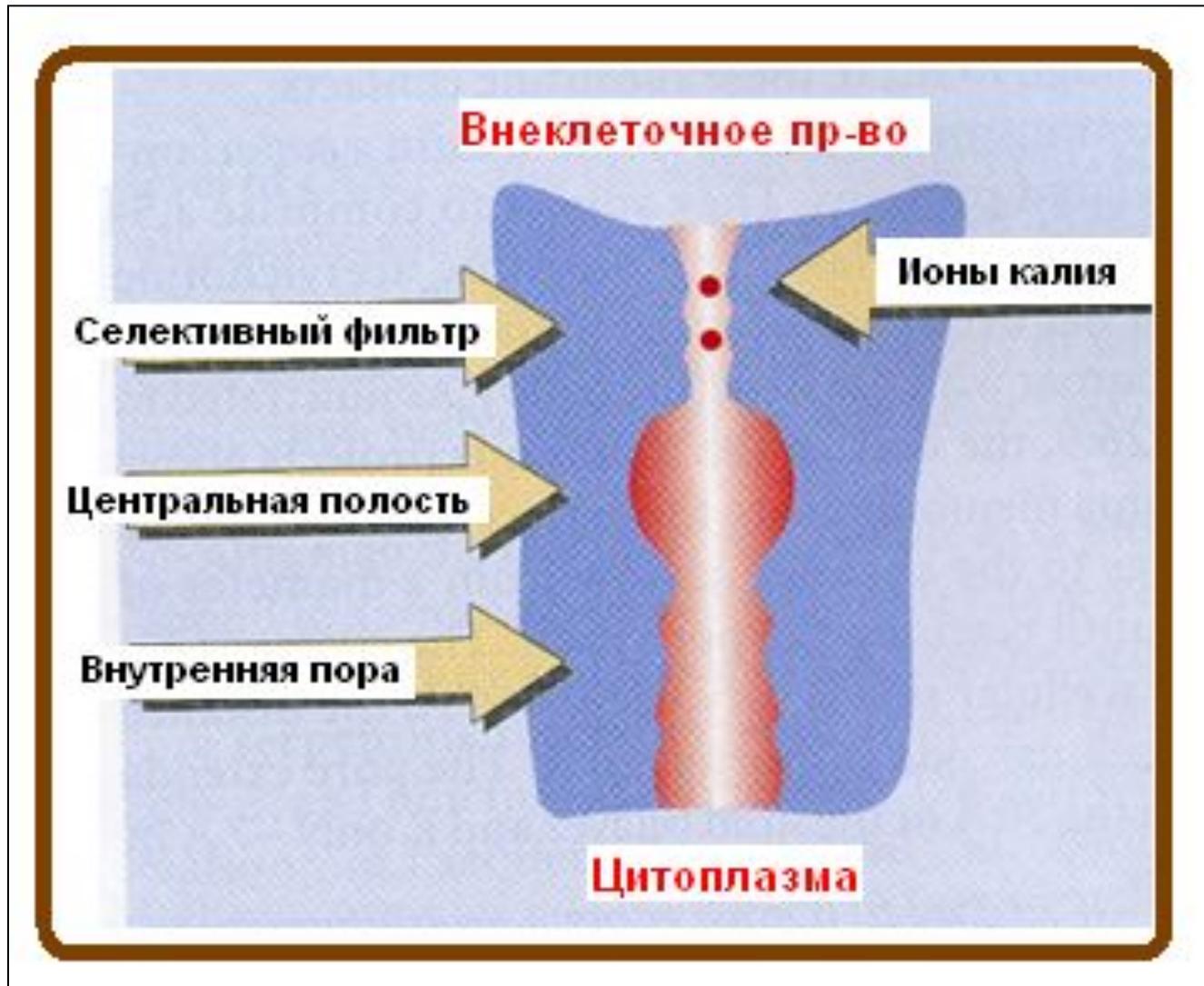
Роль заряда в прохождении сигнала



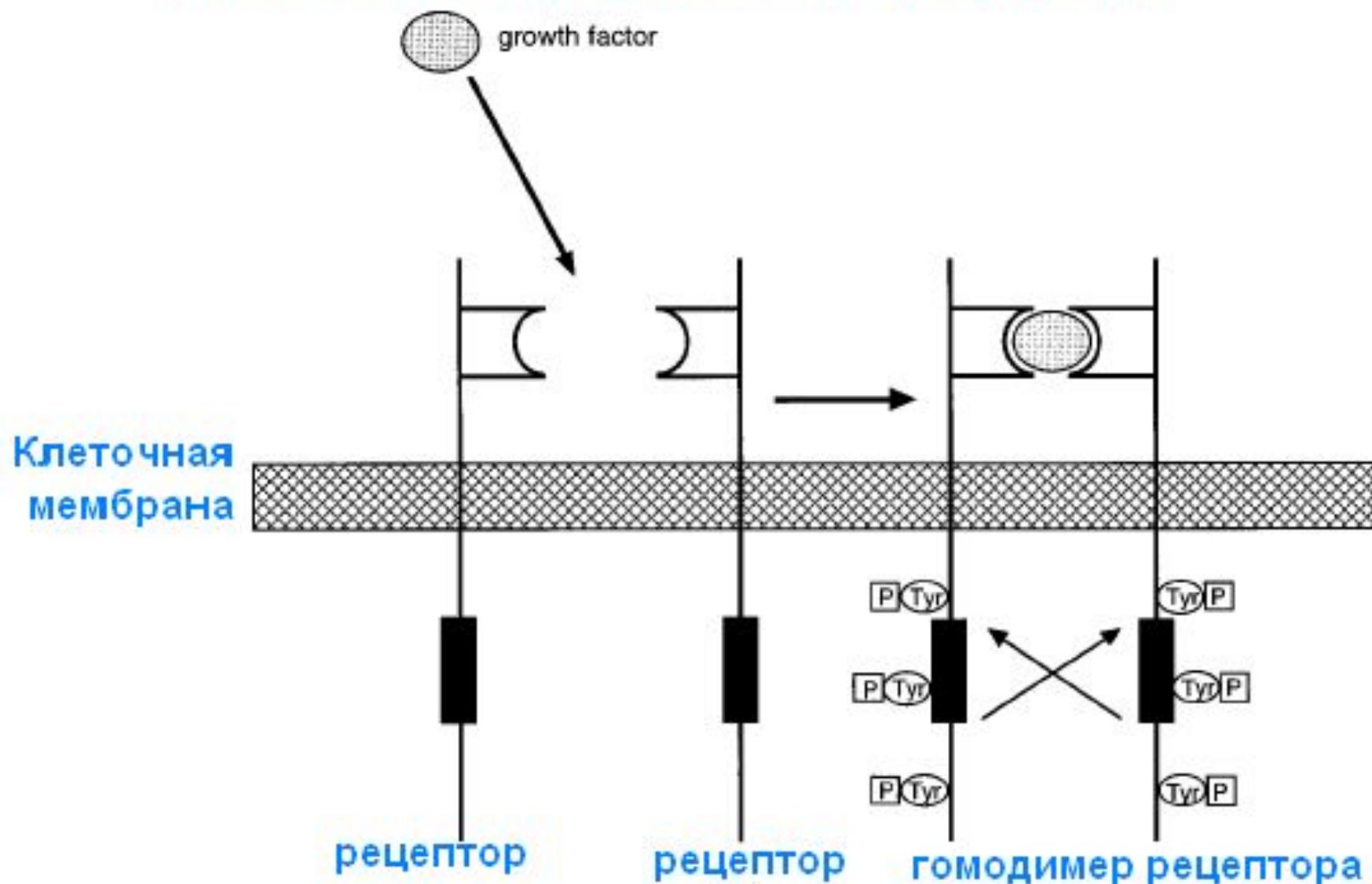
К-каналы



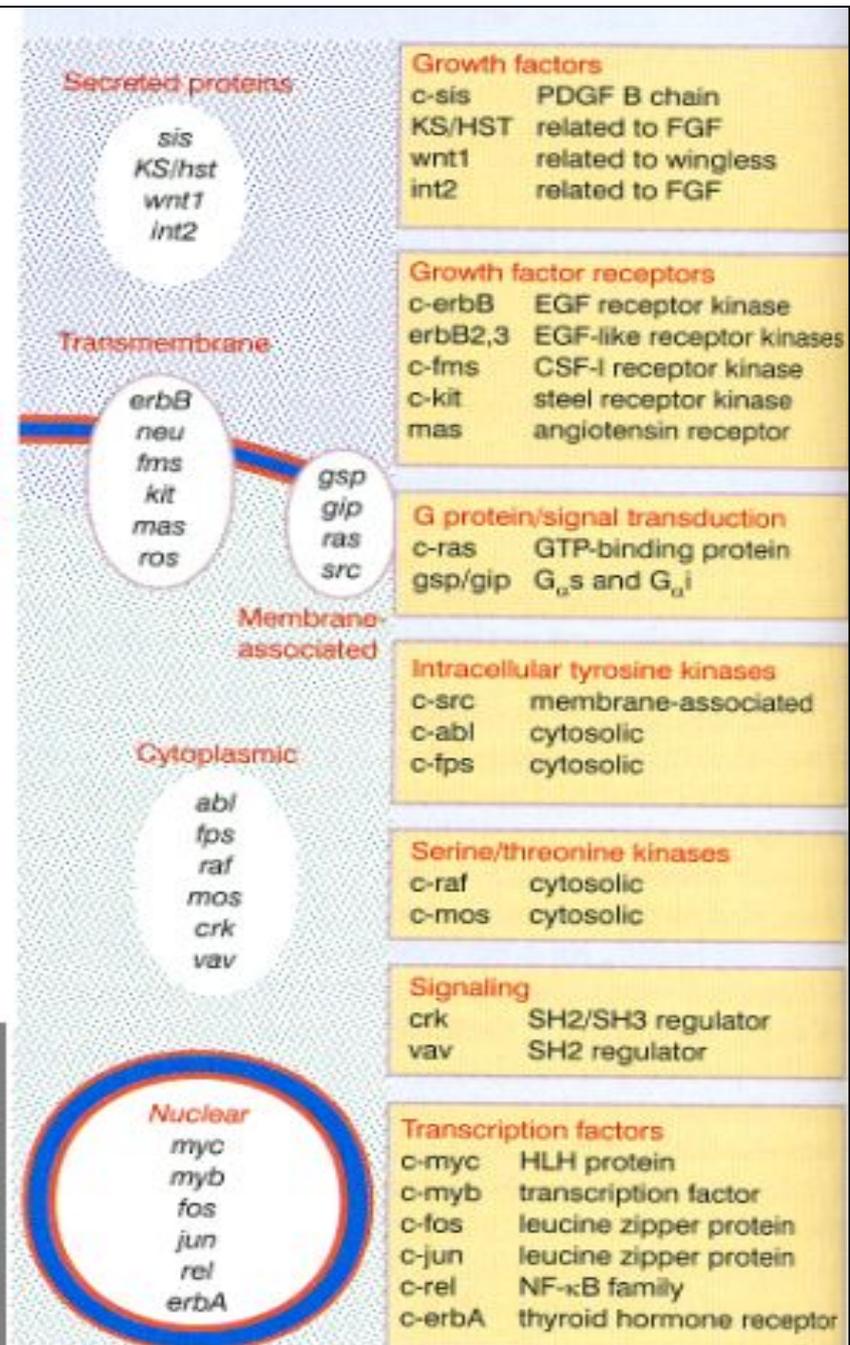
Структура K-канала



Начальный этап сигнальной трансдукции



Онкогены могут кодировать секреторные белки, трансмембранные, цитоплазматические или ядерные белки



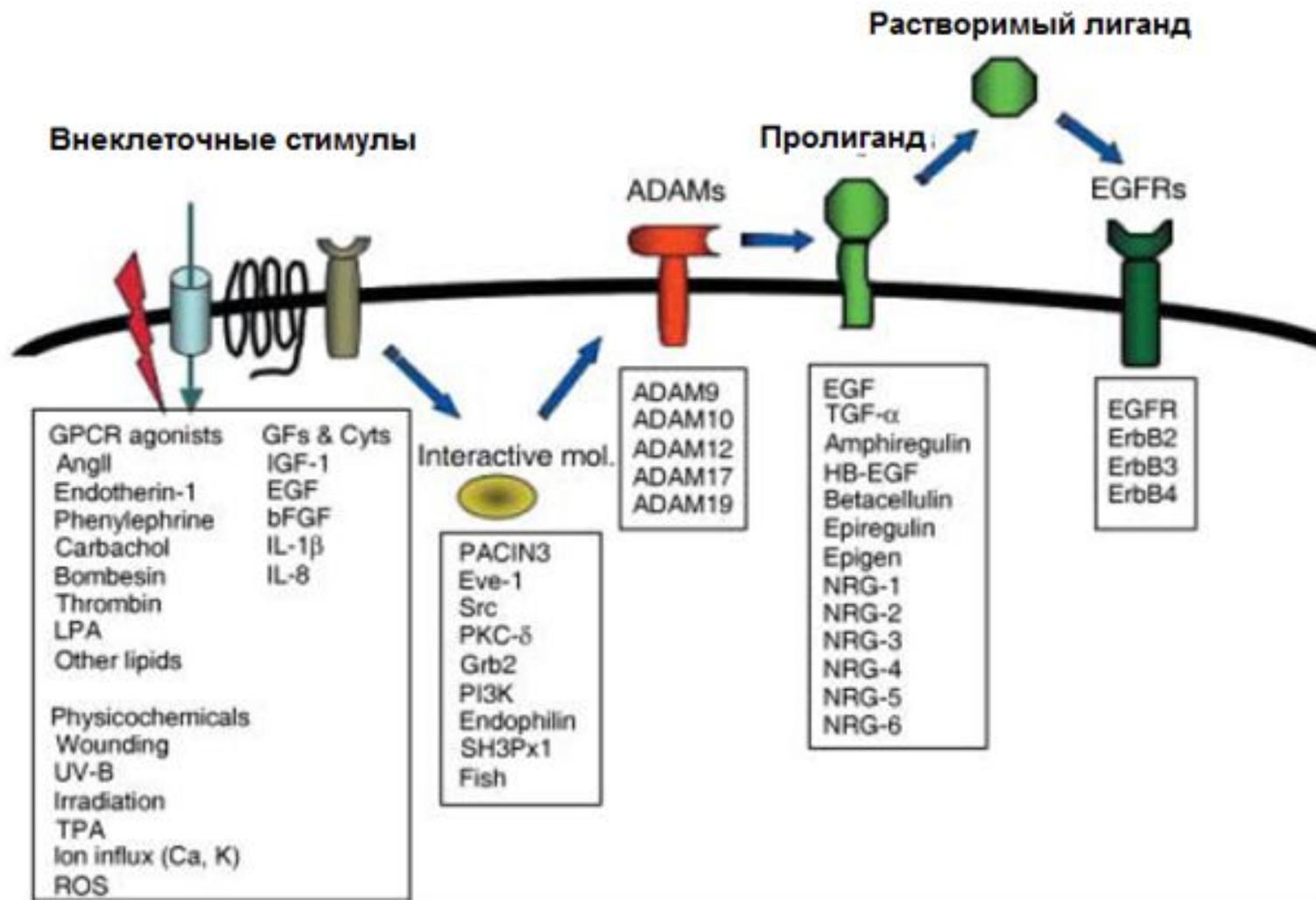
Факторы роста (GF)

- К настоящему времени установлено, что семейство факторов роста представлено 13 белками: EGF, transforming growth factor- α (TGF- α), амфирегулин, heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), бетацеллюлин, эпирегулин, эпиген, нейрорегулин -1(NRG-1), NRG-2, NRG-3, NRG-4, NRG-5 и NRG-6.
- Все члены этого семейства являются трансмембранными белками I типа и экспрессируются на клеточной поверхности таким образом, чтобы быть доступными для расщепления протеазами клеточной поверхности.

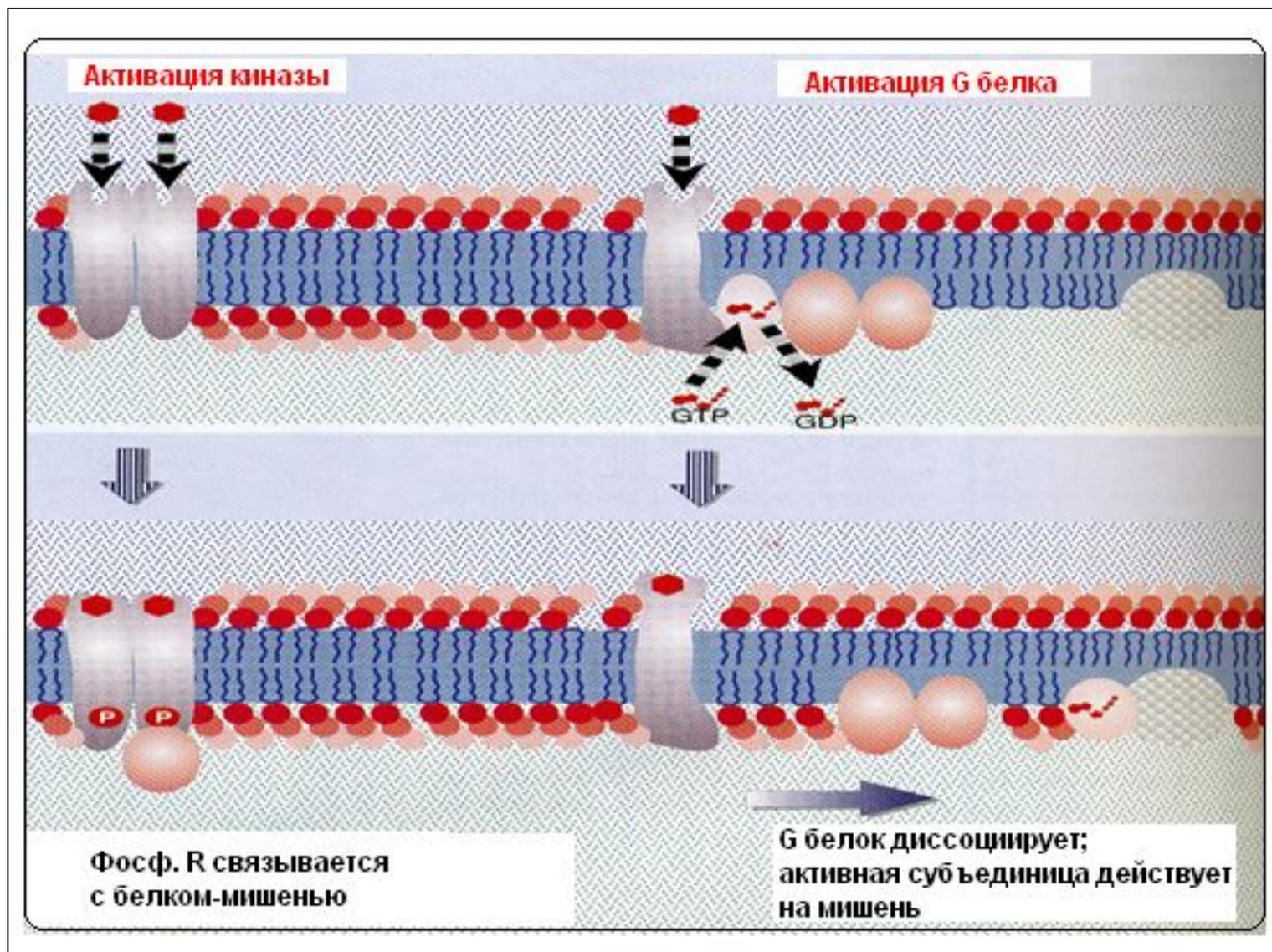
Процессинг GF

- В некоторых случаях, как это показано для фактора NRG-1beta1, его расщепление происходит в аппарате Гольджи, тогда лиганд для рецептора является растворимым. Процесс образования растворимого фактора роста получил название ectodomain shedding (растворение эктодомена). Таким образом, расщепление факторов роста является критическим в регуляции их связывания с рецептором. Показано, что во многих опухолях рецепторы EGFR часто конститутивно активированы из-за постоянного присутствия соответствующего фактора роста.

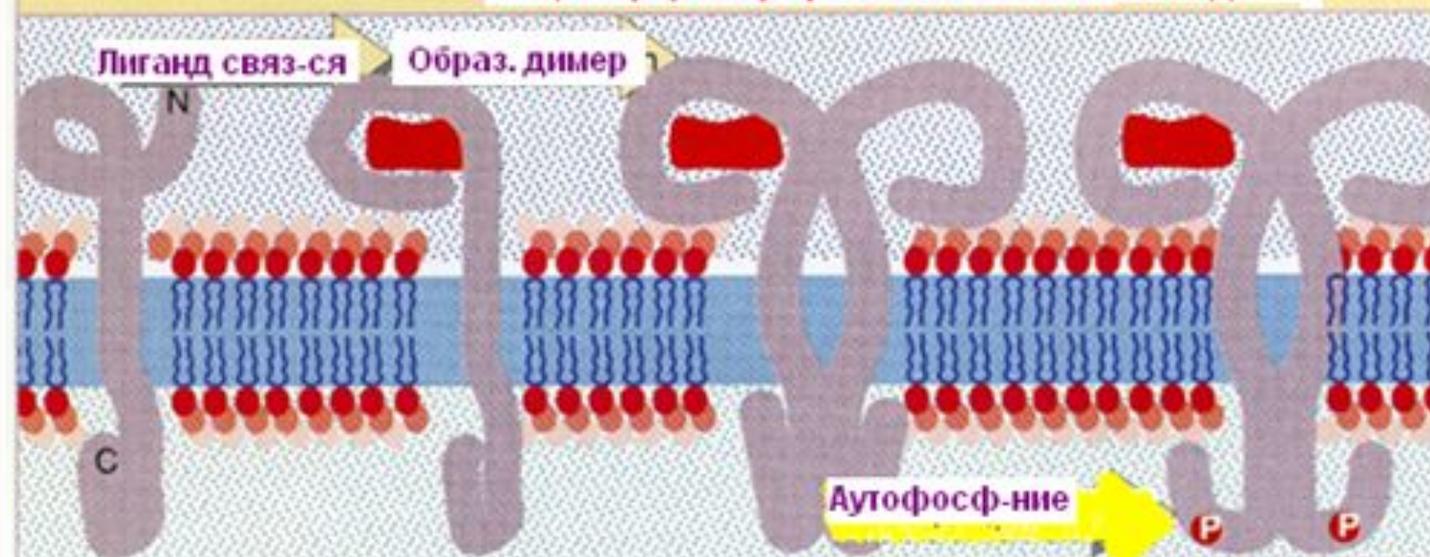
Механизм активации пролиганда протеазами и взаимодействие растворимого лиганда с рецептором.



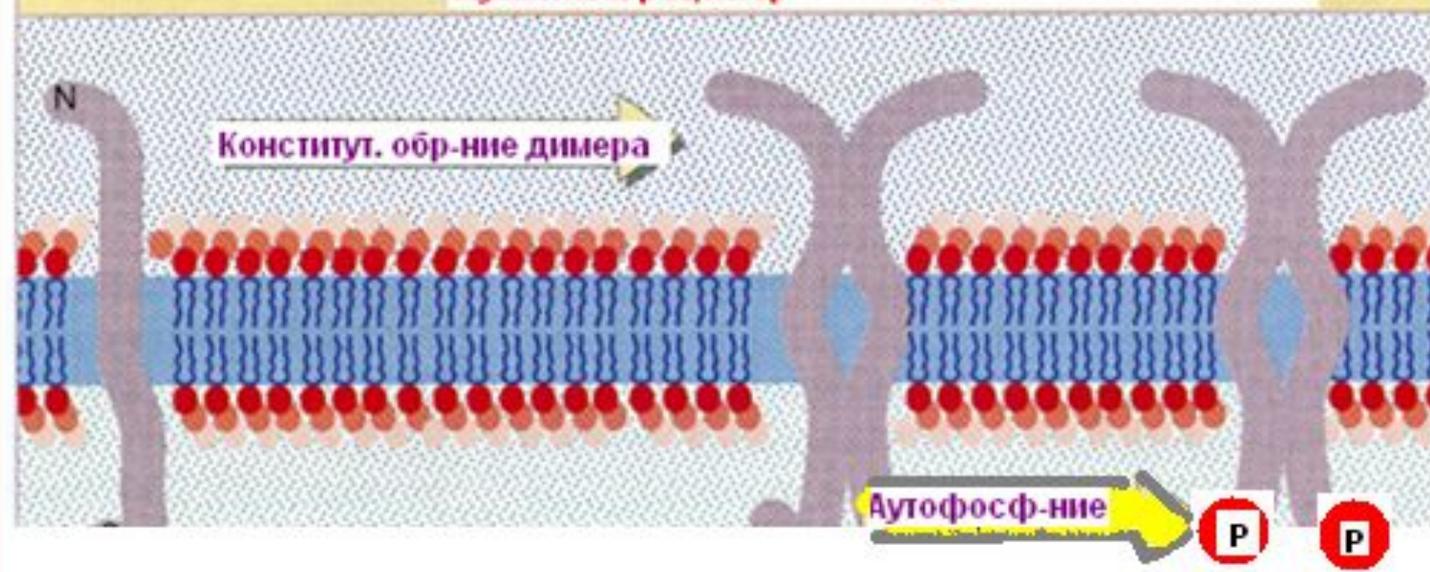
Начало СТ



Рецептор фактора роста отвечает на лиганд



Мутантный рецептор конститутивно активен



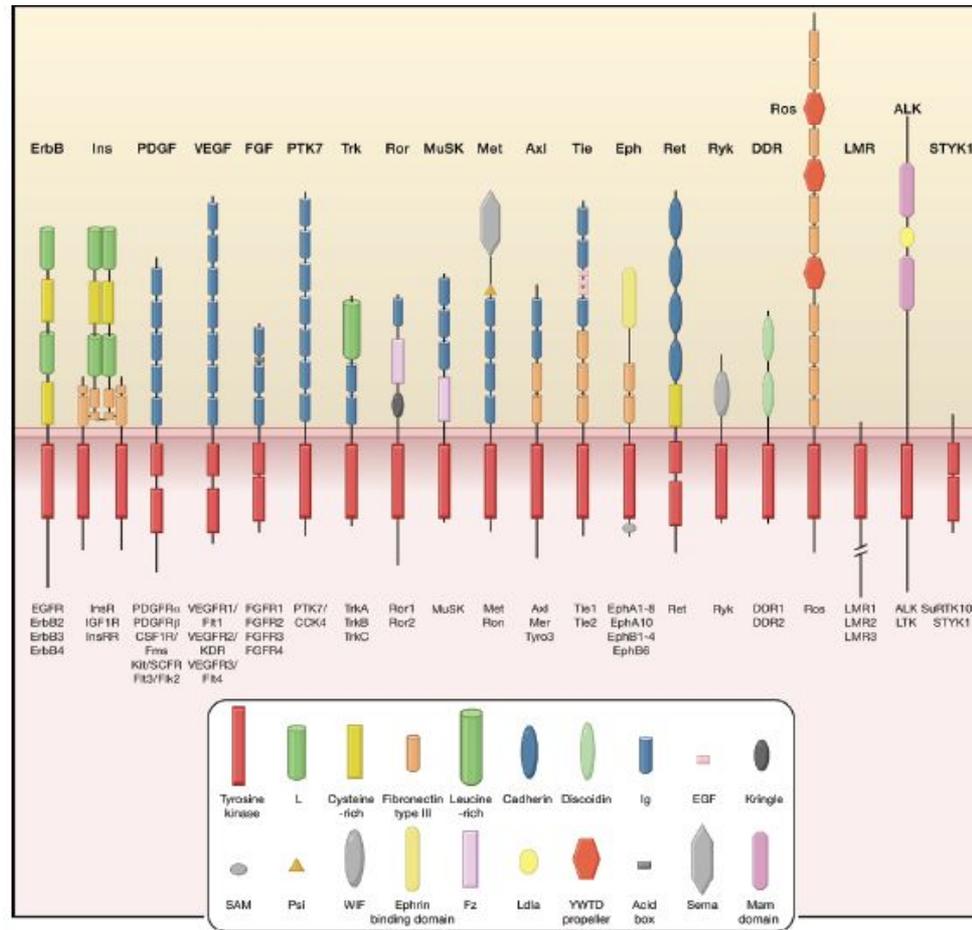
Характеристика RTKs

- У человека идентифицировано 58 RTKs, которые подразделяются на 20 подсемейств
- Все рецепторы имеют сходную молекулярную архитектуру: внеклеточный лиганд-связывающий домен, одиночную трансмембранную спираль, цитоплазматический участок, который содержит тирозин-киназный домен и дополнительный С-терминальный участок и околосмембранный регуляторный участок

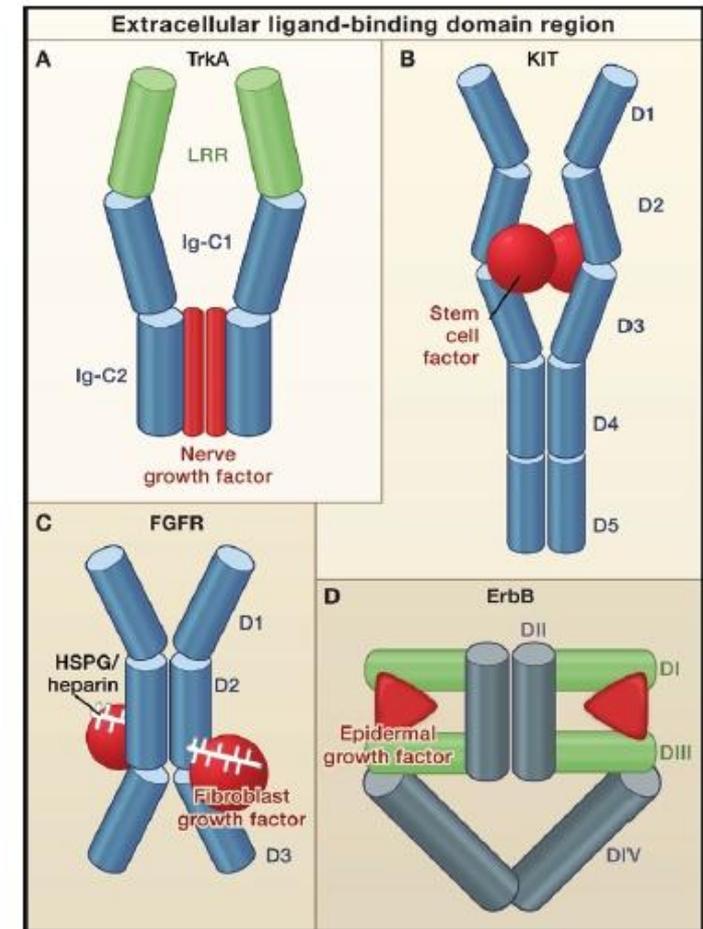
Семейство тирозин-киназных рецепторов

№	Семейство	Члены семейства	№	Семейство	Члены семейства
1	EGFR	Erb2, Erb3, Erb4	11	Axe	<u>Mer</u> , Tyro3
2	<u>InsR</u>	EGF1R, <u>InsRR</u>	12	Tie	Tie1,2
3	PDGFR	PDGFR α,β , CSF-1R, <u>Fms</u> , Kit/SCFR	13	Eph	EphA1-8, A10, B1-4, B6
4	VEGFR1 VEGFR2 VEGFR3	Fit1 KDR Fit4	14	Ret	Ret
5	FGFR	FGFR1-4	15	<u>Ryk</u>	<u>Ryk</u>
6	PTK7/	CCK4	16	DDR	DDR1,2
7	<u>Trk</u>	<u>Trk</u> A,B,C	17	<u>Ros</u>	<u>Ros</u>
8	<u>Ror</u>	Ror1-2	18	LMR	LMR1-3
9	<u>MuSK</u>	<u>MuSK</u>	19	ALK	ALK
10	Met	Ron	20	STYK1	SURTK106/STYK1

Семейство рецепторов RTKs



Внеклеточная часть некоторых рецепторов



В основном, RTKs складываются в димеры, когда лиганд (красный) связывается с внеклеточным участком рецептора

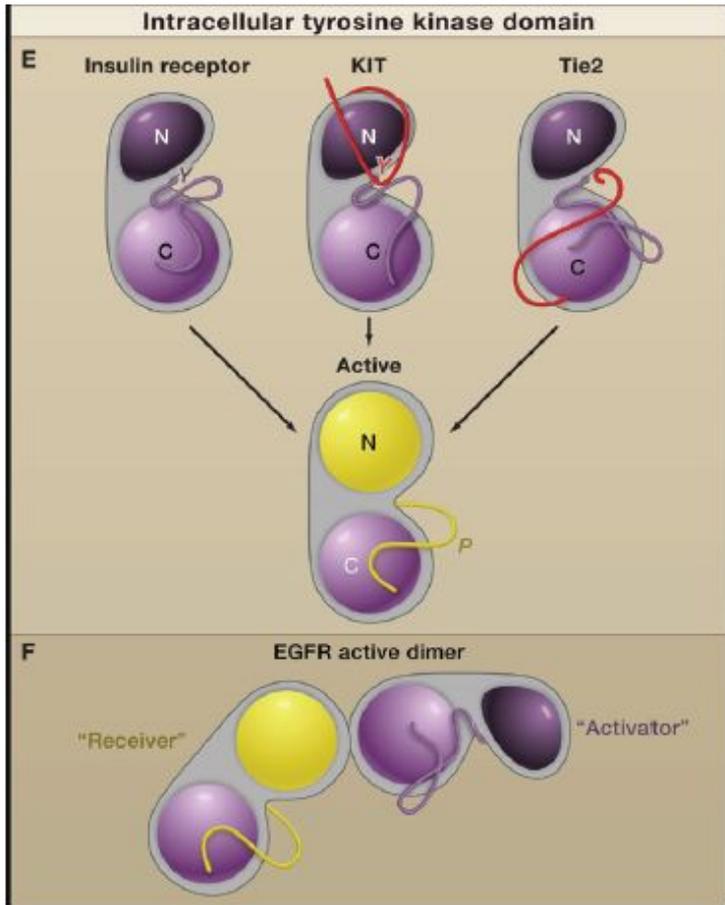
(А) Димер фактора роста нервов (красный) связывает две TrkA молекулы без прямого контакта двух рецепторов.

(В) Димер фактора стволовой клетки (красный) также связывает две молекулы КИТ. Кроме этого, два Ig-подобные домены (D4 и D5), взаимодействуют вдоль рецепторов. Тогда КИТ представляет лиганд-рецептор-опосредованную модель димеризации.

(С) Две молекулы рецептора фактора роста фибробластов (FGFR) взаимодействуют через Ig-подобный домен D2 и молекулу гепарина или гепарин сульфат протеогликан. Кроме этого, каждая молекула фактора роста фибробластов (красный) контактирует с Ig-подобным доменом D2 and D3 обоих FGFR.

(D) Димеризация рецепторов ErbB опосредована самим рецептором. Связываясь одновременно с двумя доменами (DI и DIII) одного рецептора, лиганд вызывает конформационные изменения в EGFR, что сопровождается димеризацией домена II.

Внутриклеточный домен RTKs

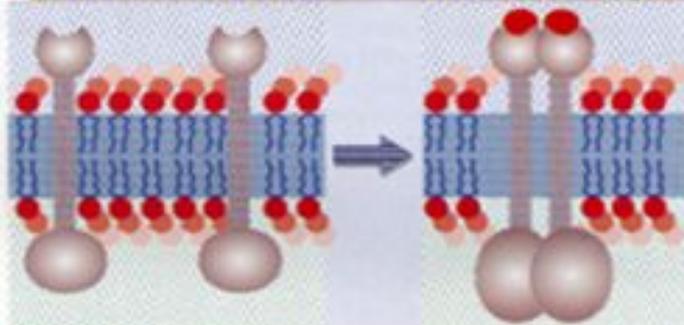


E) Инсулин рецептор-подобные *Insulin receptor-like* (активация-петля-ингибирование, *activation loop inhibition*). В FGFR, инсулиновом рецепторе и IGF1 рецепторе активационная петля взаимодействует напрямую с активным центром киназы и блокирует доступ к белковому субстрату (в FGFR) или обоим субстратам: АТФ и белку (в инсулиновом и IGF1рецепторах). Фосфорилирование ключевых тирозинов ("Y") разрушает эти аутоингибиторные взаимодействия и позволяет киназам «релаксироваться» в активном центре. *KIT-like* (*juxtamembrane inhibition*). В KIT, PDGFR и Eph рецепторах околочелюстная область (красная) взаимодействует с элементами активного центра киназы (включая спираль αC и активационную петлю), что стабилизирует неактивную конформацию. Фосфорилирование ключевых тирозинов околочелюстной области дестабилизирует эти аутоингибиторные взаимодействия и позволяет ТКД перейти к активной конформации *Tie2-like* (*C-terminal tail inhibition*). В Tie2 (и возможно Met и Ron), С-концевой хвост (красный) взаимодействует с ТКД, стабилизируя неактивную конформацию.

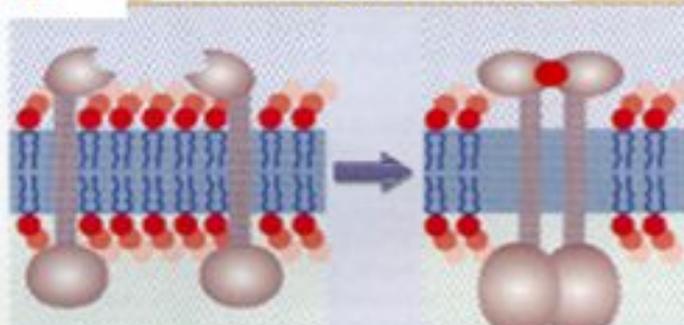
(F) Участок ТКД EGFR аллостерически активируется прямым контактом С-участком ТКД, "Активатором" и N-участком другого ТКД, "Акцептор"

Активатор ТКД дестабилизирует аутоингибиторные взаимодействия, куда вовлечена активационная петля Акцептора ТКД. Никакого фосфорилирования в этом случае не требуется.

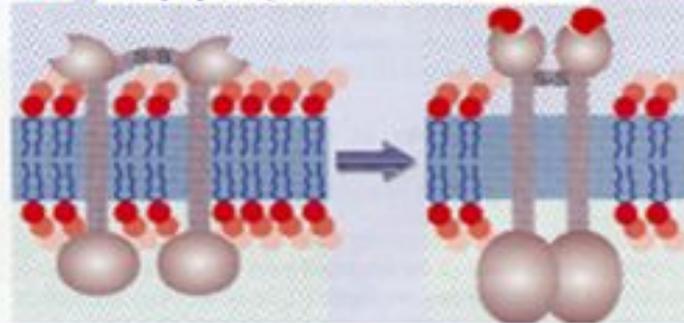
1. Связывание с L вызывает обр-е димера



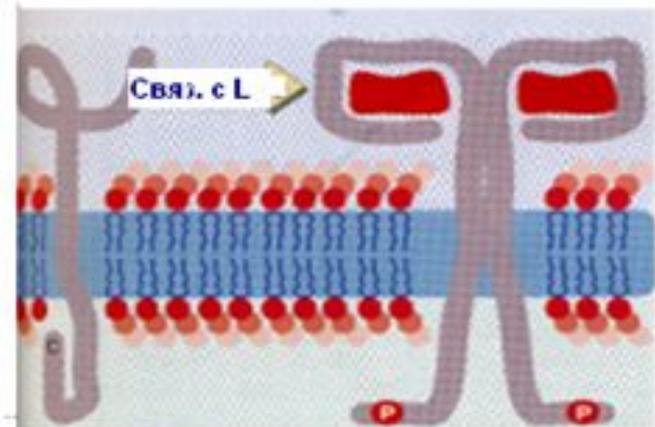
2. L связывает два мономера



3. Связывание с L вызывает конформационные изменения



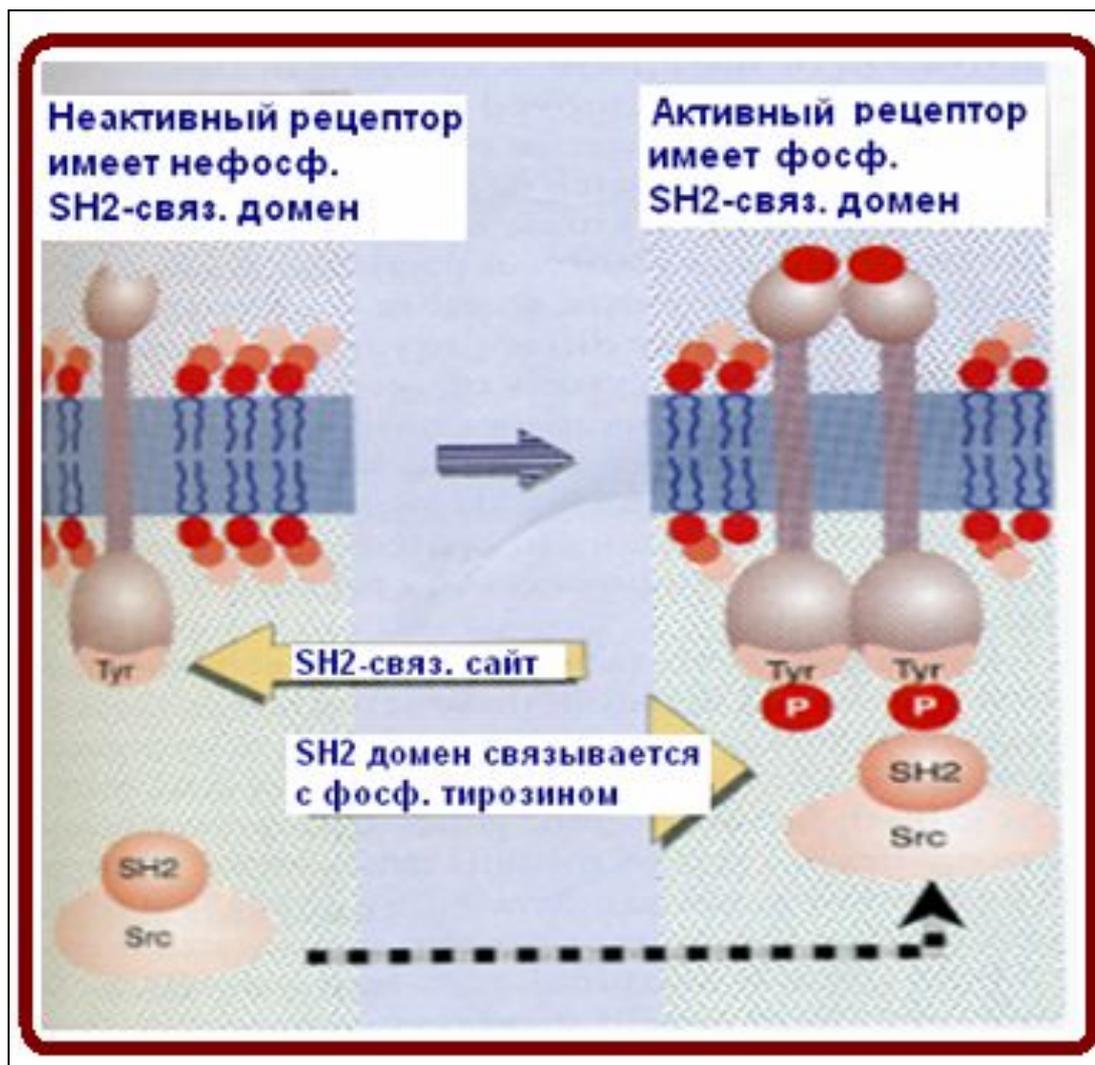
Способы активации рецепторов



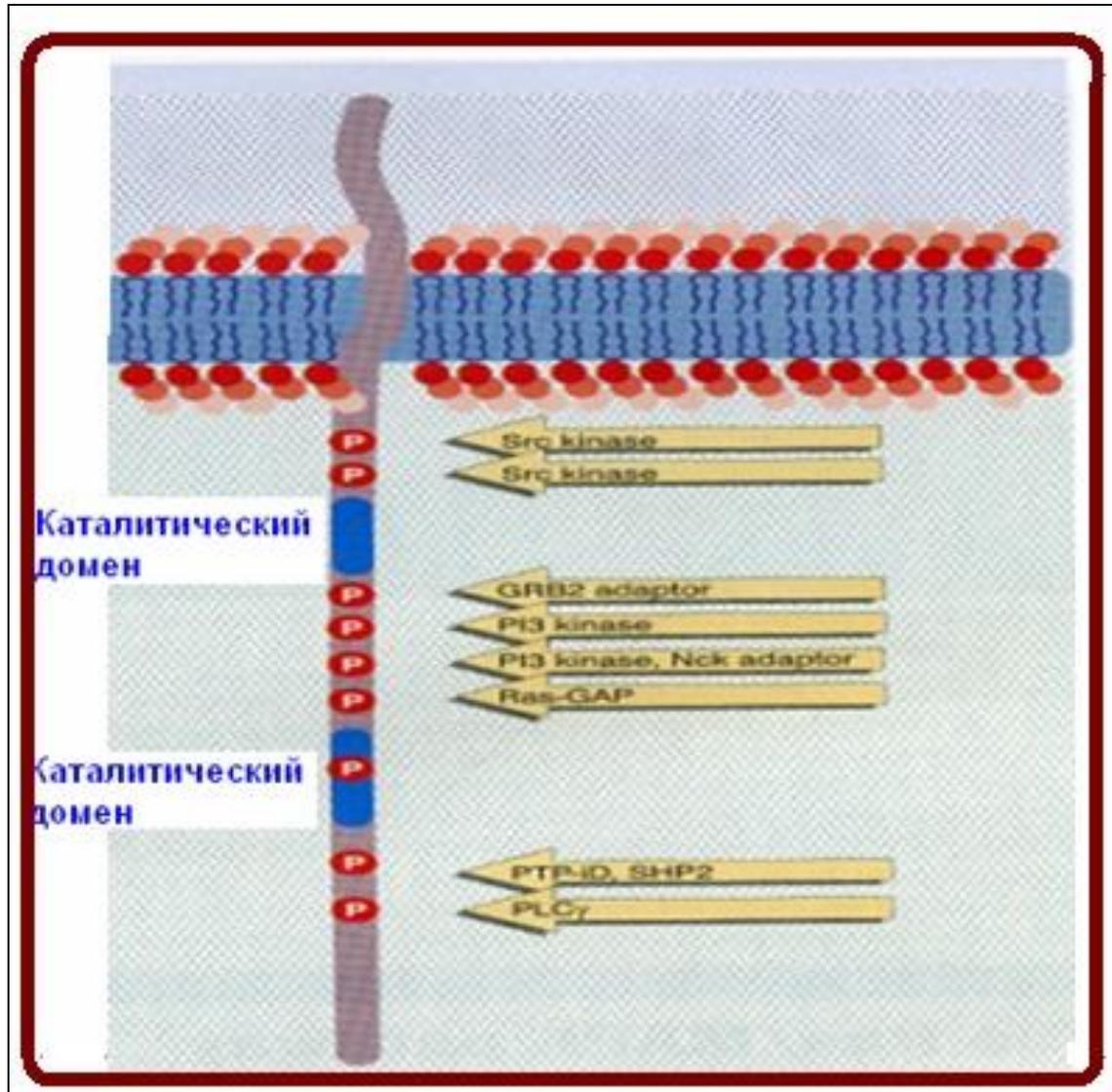
Общий итог:

- мономеры димеризуются
- цитозольный домен раскрывается
- тирозин киназа активируется
- рецептор аутофосфорилируется

Активация рецепторов сопровождается связыванием с нижестоящими молекулами



Активация PDGFR



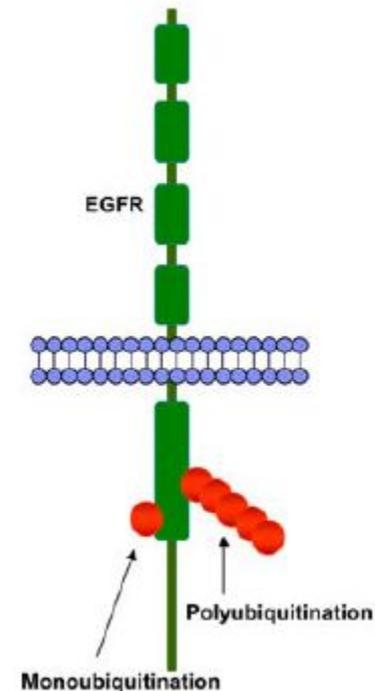
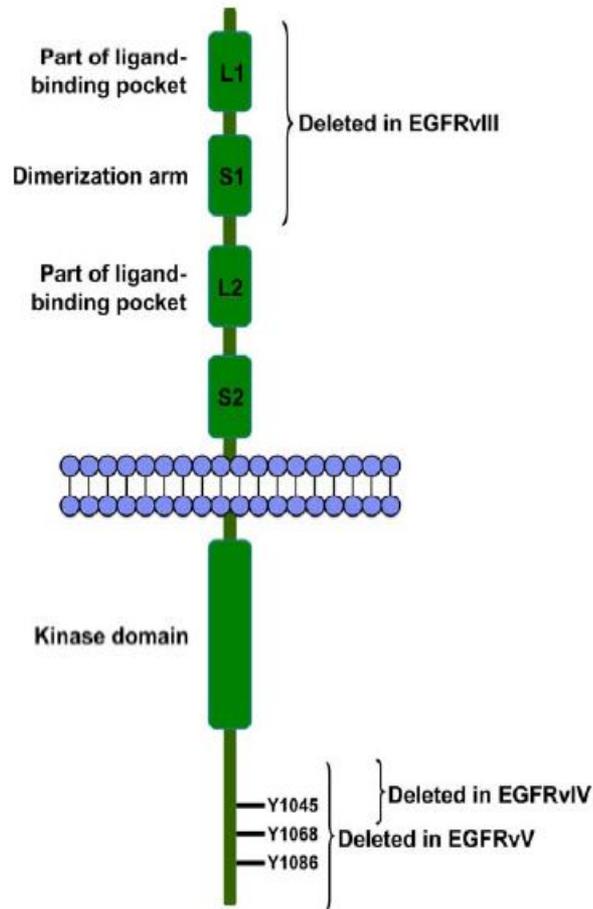
Основные характеристики некоторых ФР и их рецепторов

Лиганд	Длина Ам.к.	М.м.	Хро- мо- сома	Рецептор	Длина Ам.к.	М.м.	Хромо сома
EGF	53	6	4	EGFR	1186	170	7
FGF	125	16	5	FGFR	801	160	8
IGF	70	7.6	12	IGFR	706	130	15
TGF	50	6	2	TGFR	1186	170	7
VEGF	121	46	6	VEGFR	1273	180	13
PDGF	110	14-18	7	PDGFR	1066	170	4

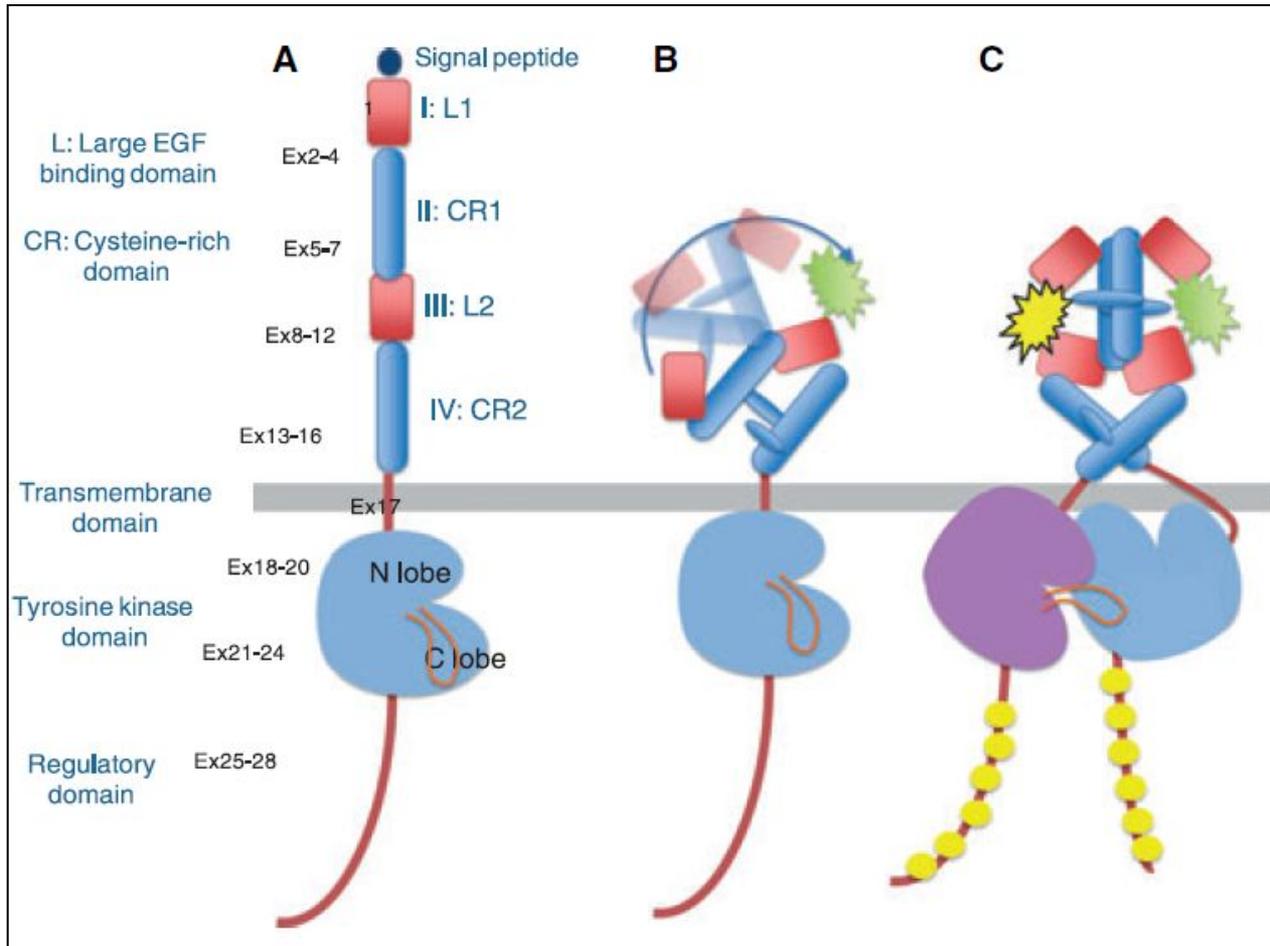
Семейство Epidermal growth factor receptor (EGFR)

- EGF был изолирован в 1962 Stanley Cohen.
- Его взаимодействие с EGFR подтверждено в 1975.
- В 80-х установлено сходство EGFR с v-erbB (avian erythroblastosis virus)
- EGFR (также известен как ERBB1/HER1), ERBB2/HER2/NEU, ERBB3/HER3 и ERBB4/HER4.
- ERBB2, ERBB3 и ERBB4 показывают экстраклеточную гомологию
- относительно EGFR 44, 36 и 48%, соответственно, тогда как для тирозин-киназного домена - 82, 59 and 79%, соответственно.
- EGFR ген локализован на хромосоме 7p12-13 и кодирует
- 170kDa рецептор тирозин киназу.

Общая структура EGFR



Структура EGFR белка (А), активация (В) и димеризация лигандом (С)



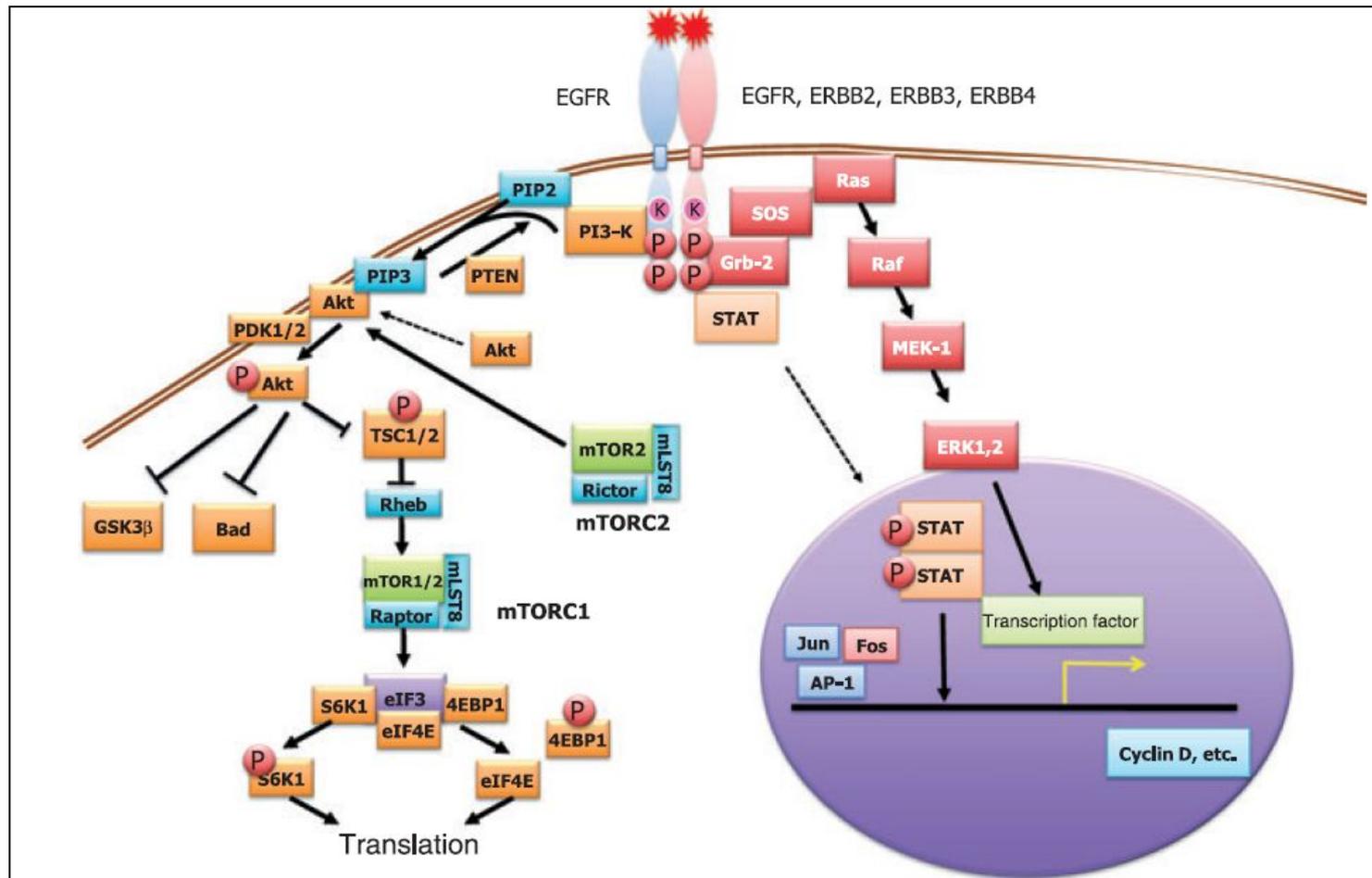
Лиганды для EGFR

- Идентифицировано 11 лигандов, которые разделены на 3 группы:
- 1. EGF, transforming growth factor- α , ампирегулин и эпиген)
- 2. EGFR и ERBB4 (betacellulin, heparin-binding EGF и epiregulin);
- 3. neuregulin (NRG) (также известен как heregulin) связывается с ERBB3 и ERBB4.

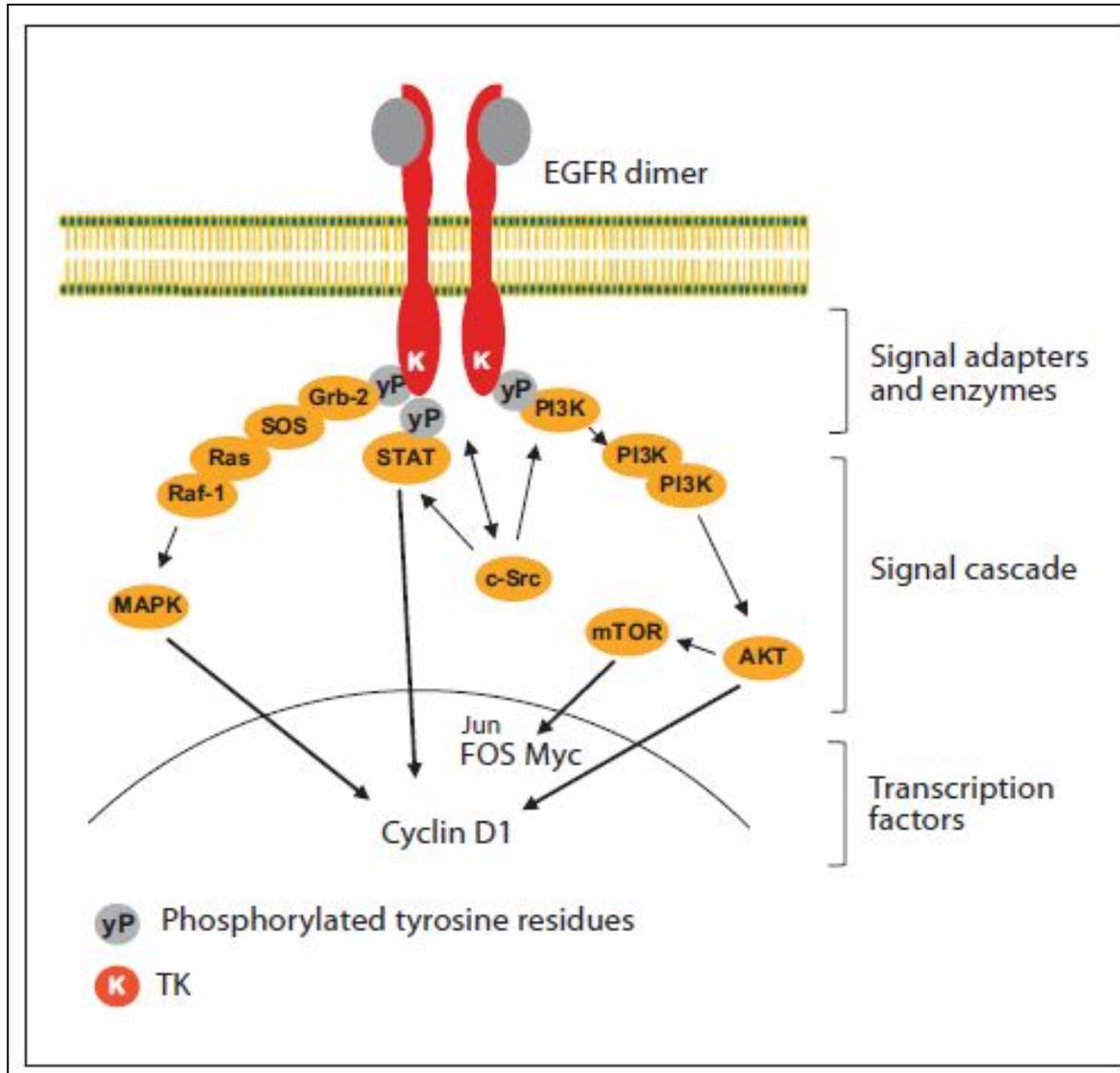
Субстраты для EGFR

- Phospholipase C α , CBL, GRB2, SHC и p85.
- Включая mitogen-activated
- protein kinase, phosphatidylinositol 3-kinase /АКТ и
- the signal transducer and activator of transcription (STAT)3 and STAT5 pathways (см. ниже)

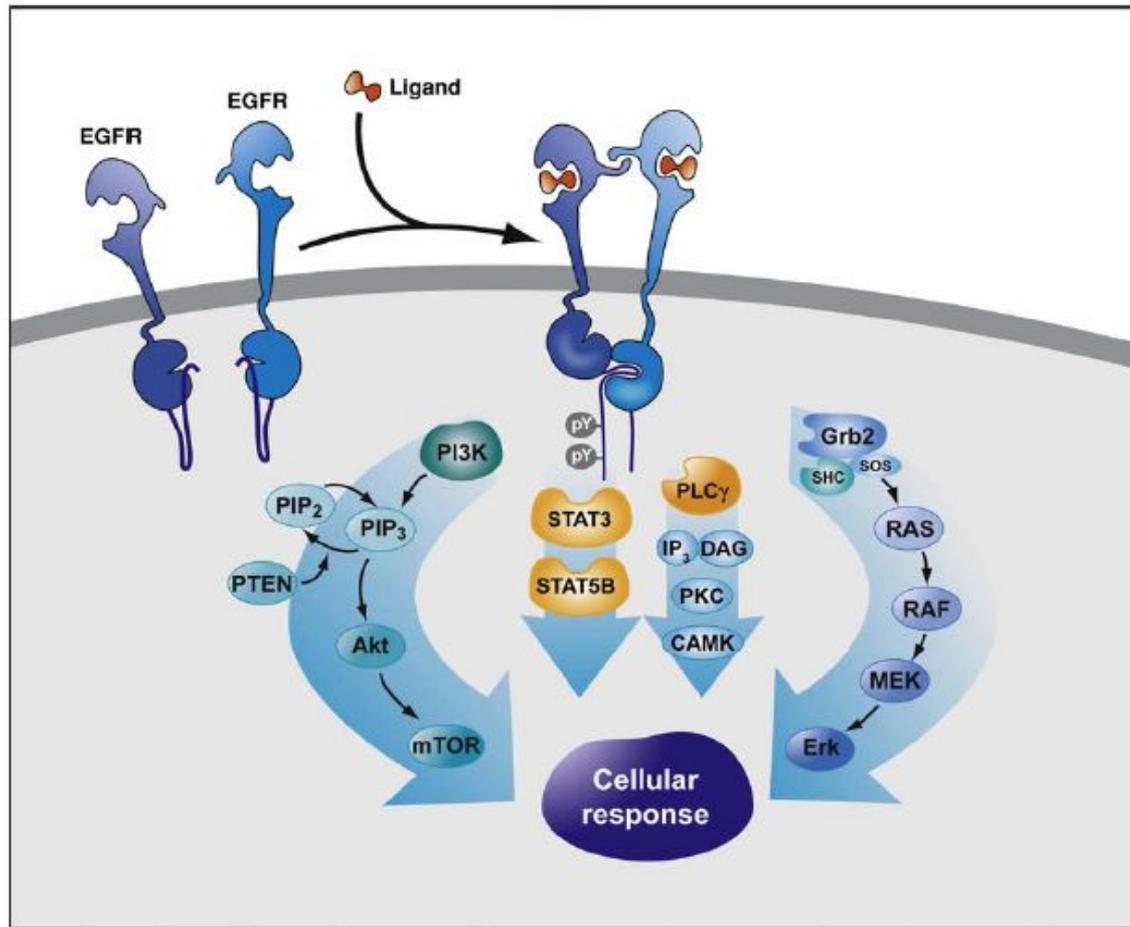
Активируемые пути СТ



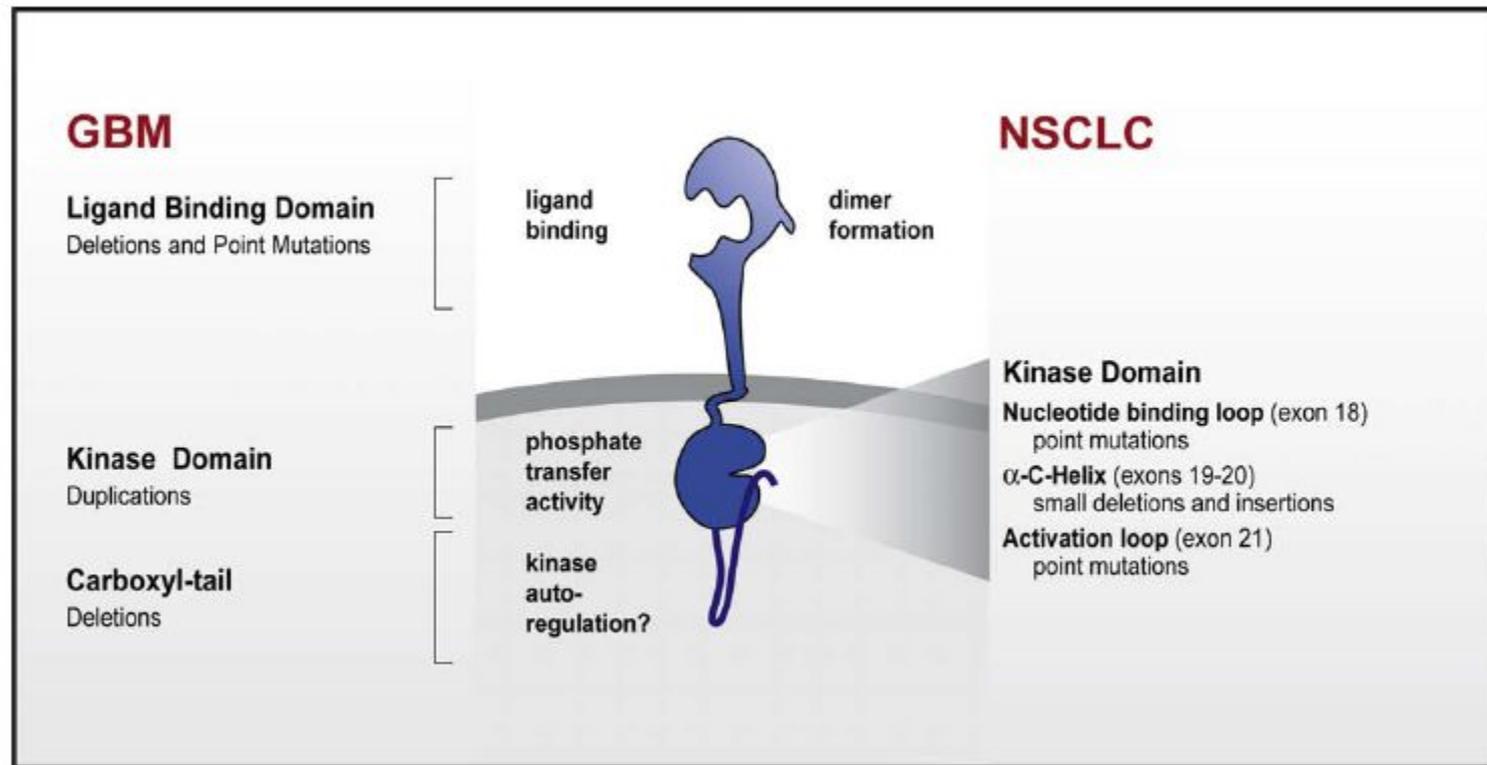
Активируемые пути СТ



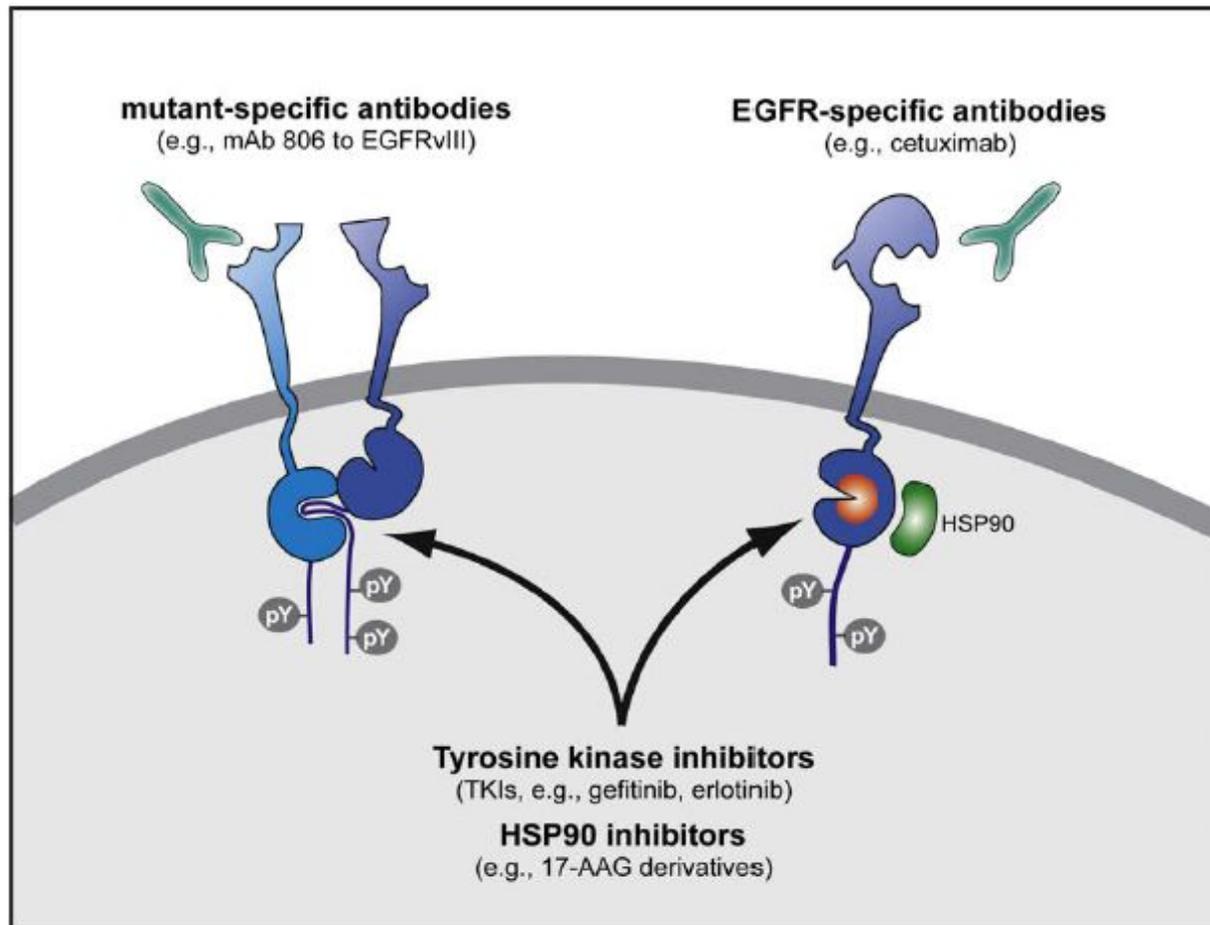
Активируемые пути СТ



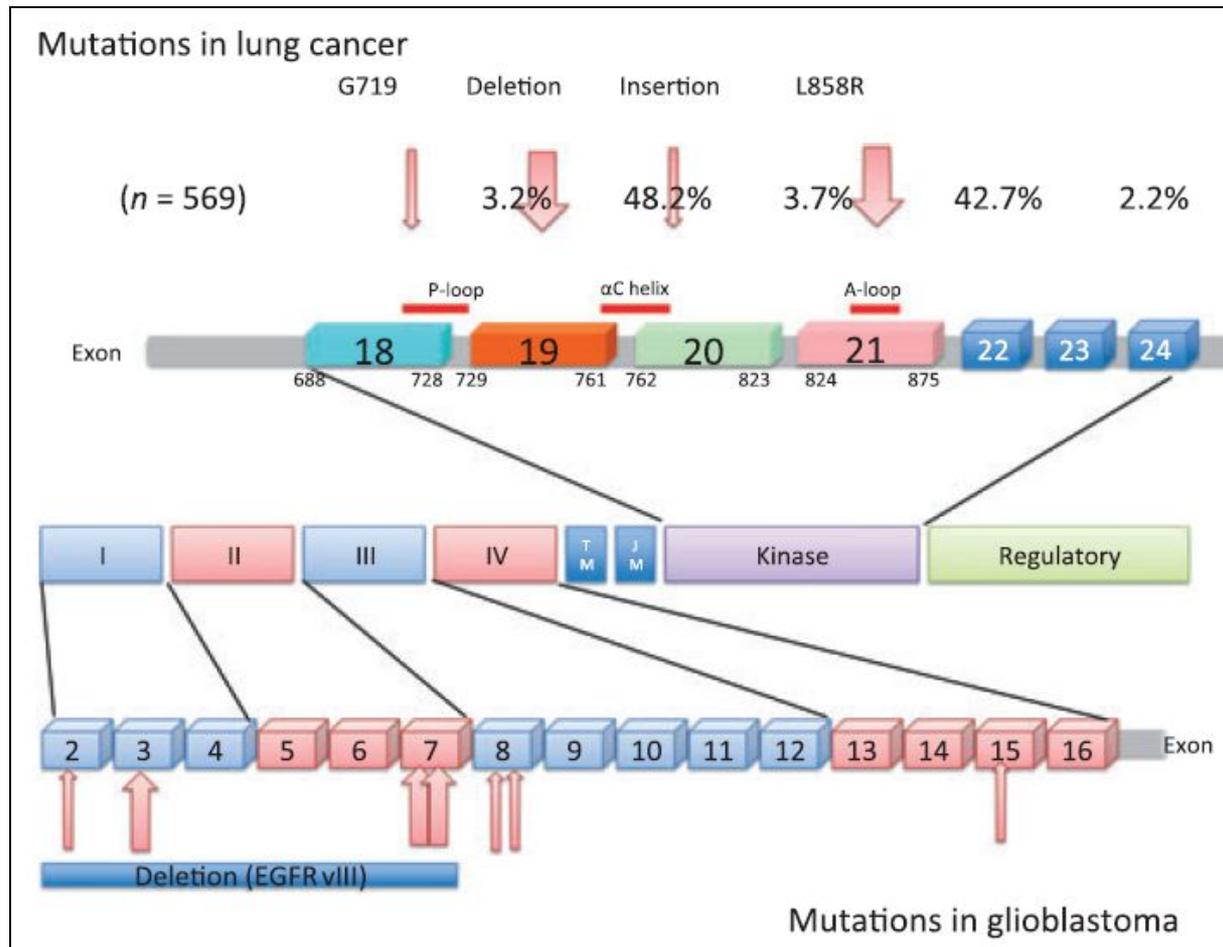
Мутации в раковых клетках мозга (глиобластома) и легких



Таргетная терапия EGFR-СТ

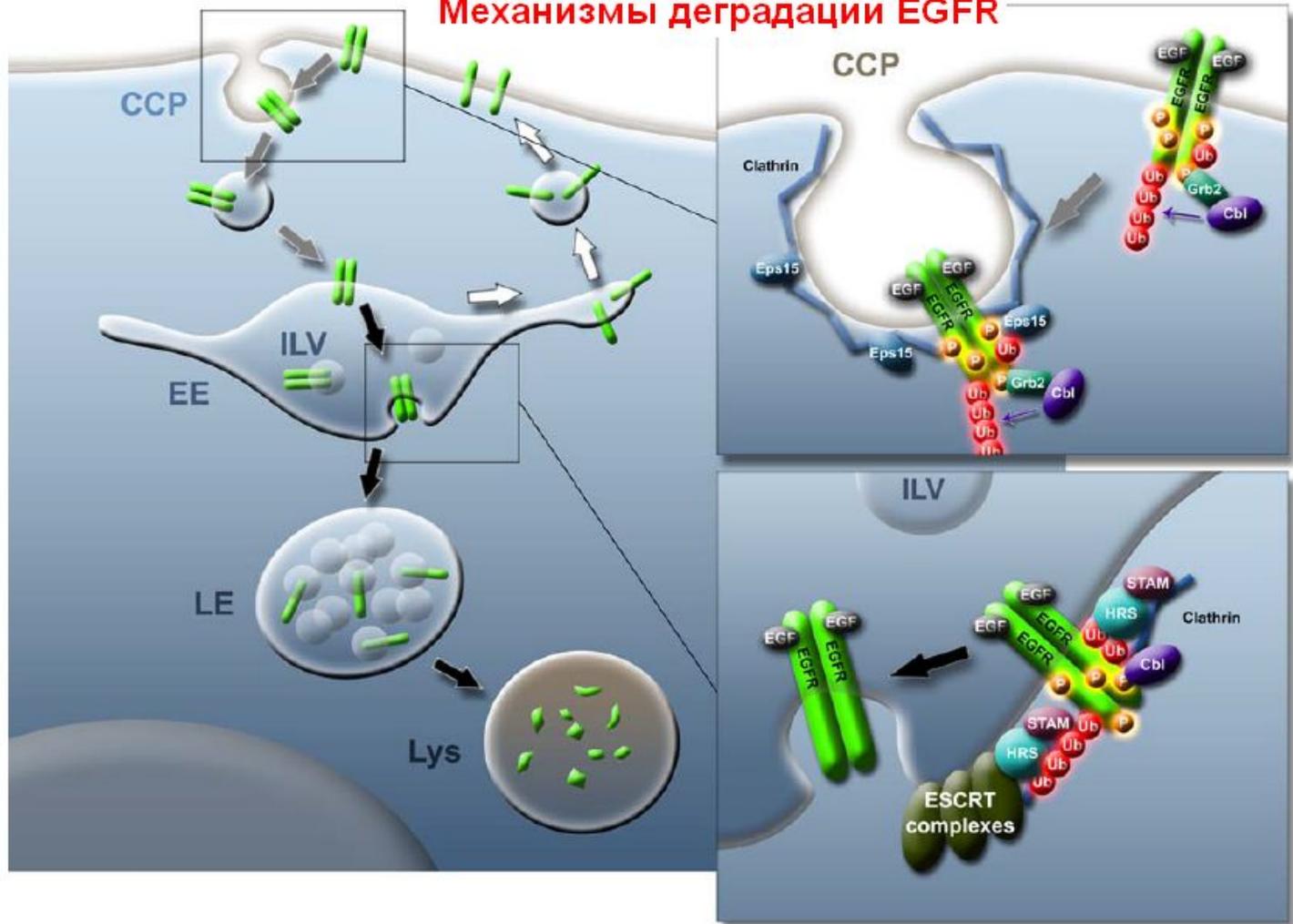


EGFR и рак



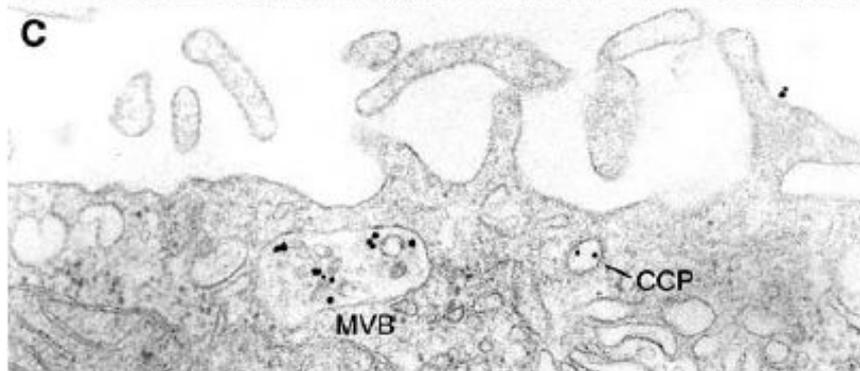
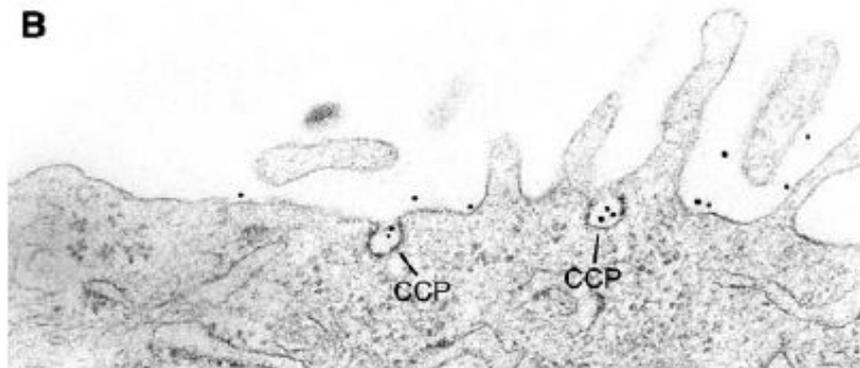
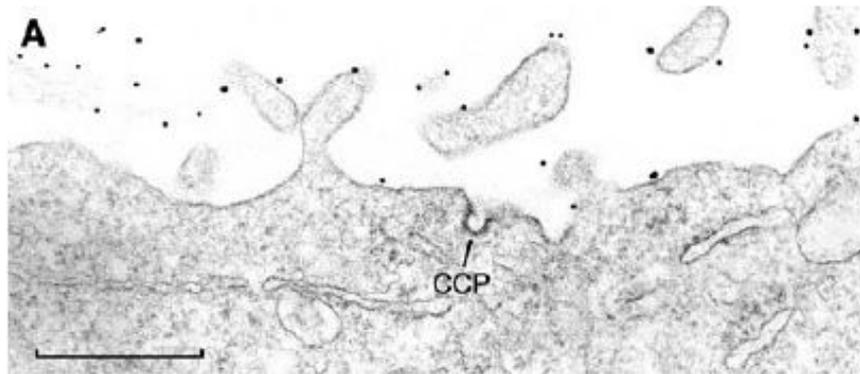
Down-регуляция EGFR

Механизмы деградации EGFR



Internalization and endosomal sorting of EGFR. Main figure: upon activation, EGFR (green) is translocated to clathrin coated pits (CCP) on the plasma membrane and internalized (grey arrows). After transport to early endosomes (EE), EGFR is either recycled back to the plasma membrane (white arrows) or taken up into intraluminal vesicles (ILVs). EE will mature to late endosomes (LE), and EGFR in ILVs will eventually be degraded in lysosomes (Lys) (black arrows). *Upper insert* At the plasma membrane, EGF-activated EGFR dimerize and the kinase activity of the receptors phosphorylates tyrosine residues (P) in EGFR. This creates docking sites for intracellular proteins such as

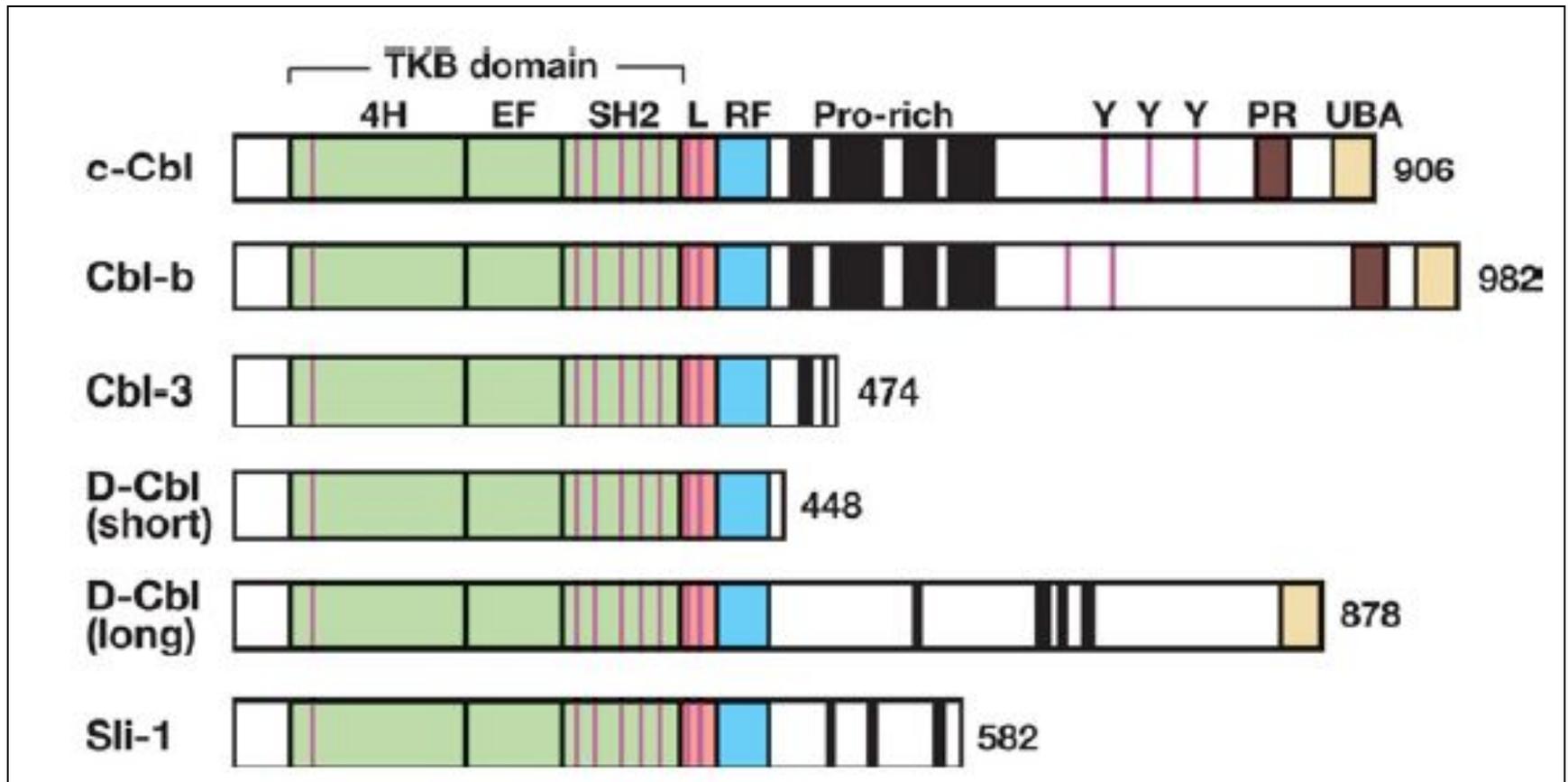
Grb2. Grb2 mediates binding of the ubiquitin ligase Cbl that adds mono- or polyubiquitins (Ub) to EGFR. Activated EGFR is transported to clathrin coated pits that in addition to clathrin also consists of Eps15 and other proteins. *Lower insert* At the EE vacuolar membrane, EGFR destined for degradation still binds Cbl and is continuously phosphorylated and ubiquitinated. The EGFR ubiquitins are bound by Hrs that resides in at Hrs/STAM/clathrin coat, and this is followed by binding of ESCRT complexes to the ubiquitinated EGFR leading to uptake into ILVs



Интернализация EGFR

Crosslinking of ErbB2 induces receptor internalization. Fixed SK-BR-3 breast cancer cells have been incubated with a mouse monoclonal antibody against the extracellular N-terminal part of ErbB2, and subsequently with a gold-conjugated anti-mouse antibody. Thereafter the cells were embedded in Epon, sectioned and examined in the electron microscope. It is seen that ErbB2 is mainly associated with membrane protrusions. An empty clathrin-coated pit (CCP) is also seen. **b, c** SK-BR-3 cells have been incubated for 1 h at 37°C with the anti-ErbB2 antibody followed by the gold-conjugated antibody before fixation and embedding. Note how the antibody crosslinking drives ErbB2 down from the protrusions to the bulk membrane, where it is seen in clathrin-coated pits (CCP). Labeling of a multivesicular body (MVB) is also seen in **c**, showing that crosslinked ErbB2 is internalized. For details see (Hommelgaard et al. [2004](#)).

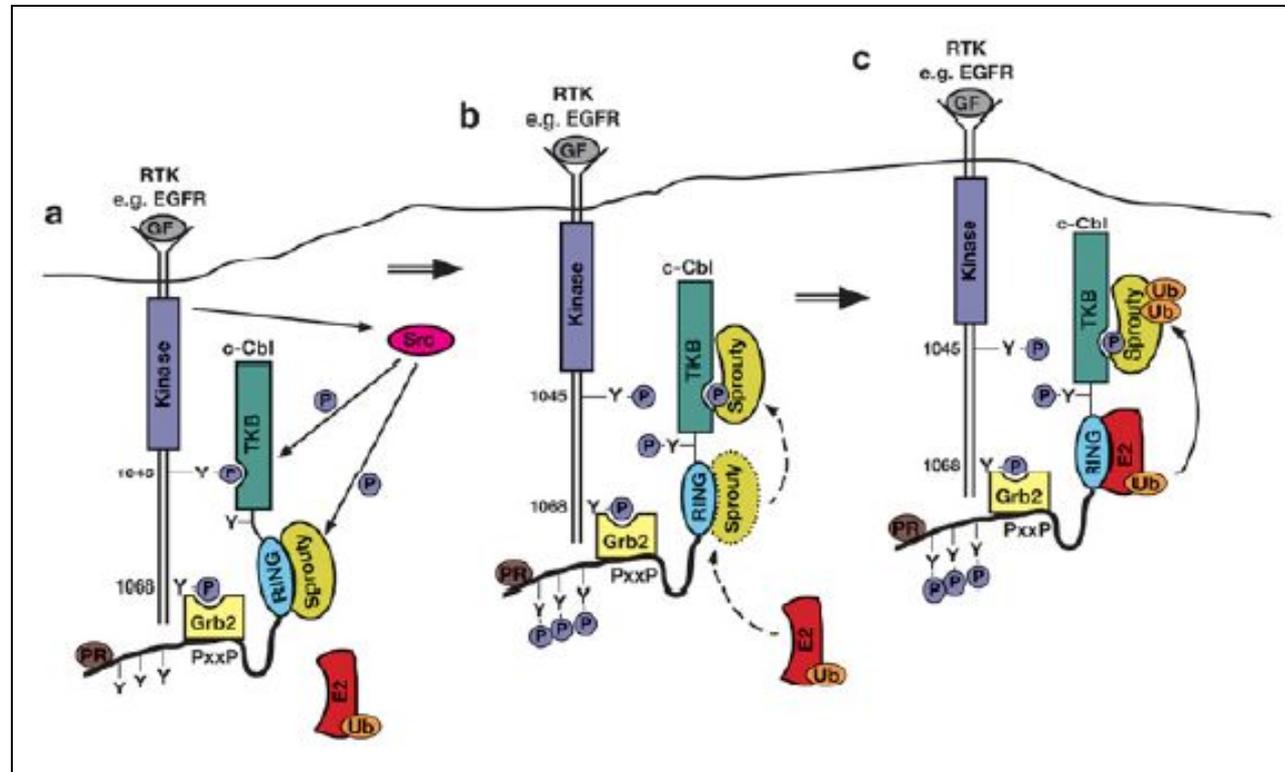
СЫ-белки в СТ



Сbl-направленная интернализация, мультиубиквитилизация и деградация активированных RTKs

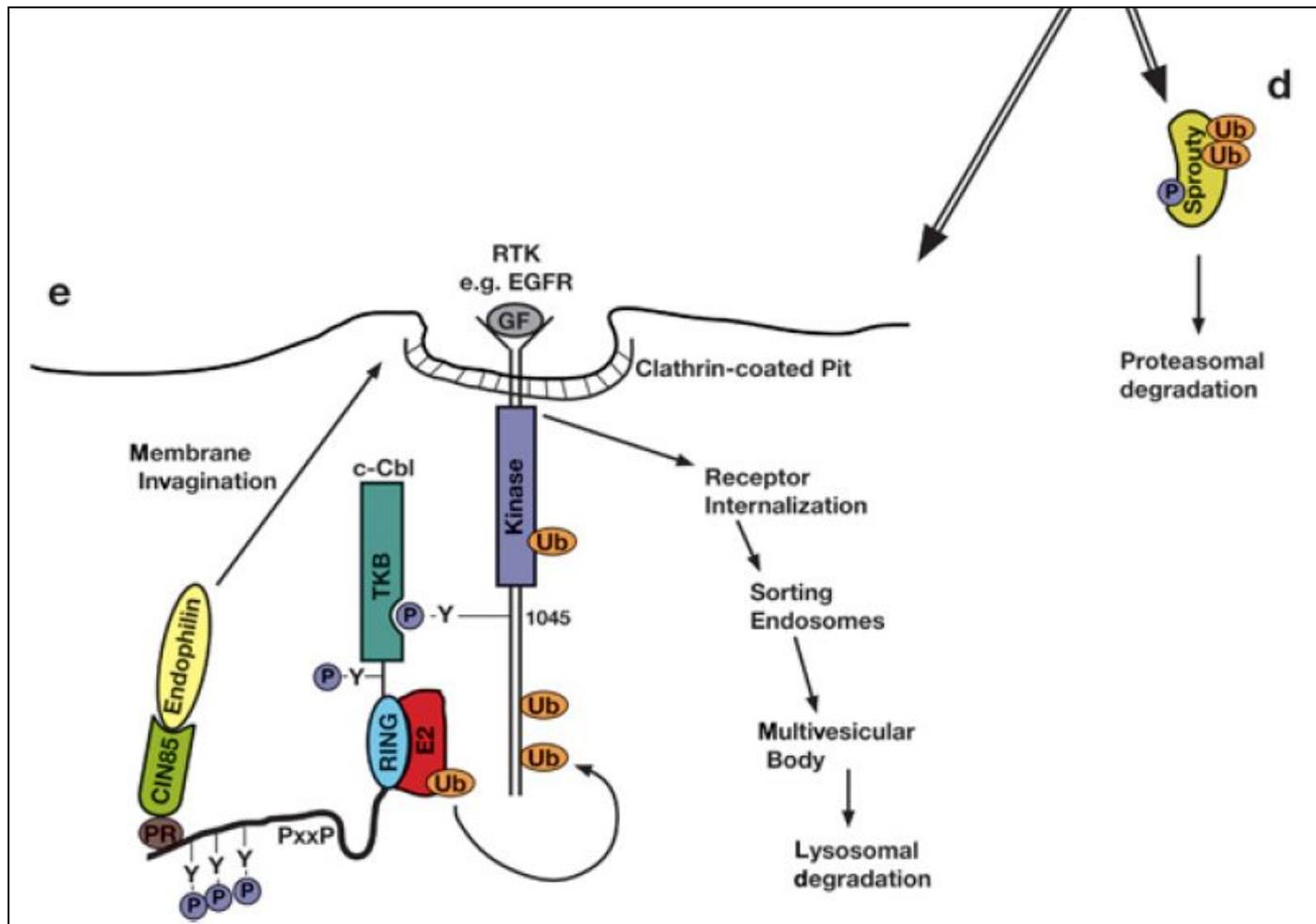
а). Присоединение GF индуцирует фос-ие RTK и мобилизацию Cbl к активированному рецептору с помощью адаптерного белка Grb2, к. необходим для эндоцитоза рецептора. Это позволяет ТКВ-домену быть фосфорилированным RTK (нпр. pTyr1045 EGFR). Активация Src киназ после

связывания GF индуцирует ф-ие Cbl и др. белков, включая Sprouty. Ассоциация Sprouty с RING пальцевым доменом инициирует ингибирование активации Cbl ферментами Ubc (E2s), но ф-ие по тирозину Sprouty снимает это ингибирование высвобождением его из RING пальцев к ТКВ домену. (b). Это разрешает RING рекрутировать E2 конъюгирующий белок, к. ускоряет полиубиквитиляцию Sprouty (c) и деградацию (d)

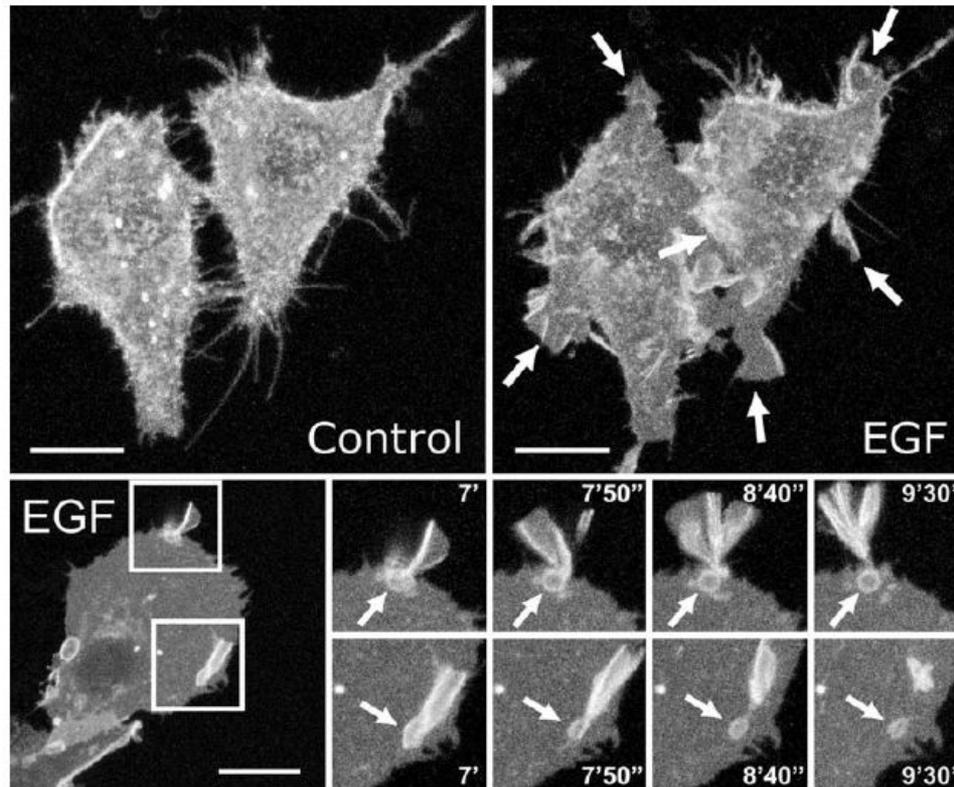


TKB домен имеет свободный доступ к рецептору (pTyr1045 EGF рецептор) и E3 лигазная функция Cbl может катализировать транспорт убиквитина от RING-finger-bound E2 к RTK (e). Этот процесс опосредует интернализацию рецептора. Продолжающееся добавление УБ приводит к мультиубиквильяции, что является сигналом для переноса в лизосомы, где рецептор деградирует. Фосфорилирование Cbl также усиливает образование CIN85–endorphin комплекс через новый пролин-арг. мотив (PR).

Этот комплекс помогает усилить интернализацию рецептора. Фосфорилирование Cbl также рекрутирует SH2-белки, такие как Crk и p85 для усиления сигнала.



Активация EGFR



EGF induces membrane ruffling and macropinosytosis. HEp2 cells expressing GPI-GFP as a marker of the plasma membrane were followed by 3D confocal microscopy over time. The *upper panel* shows two cells that were imaged before and 5 min after stimulation with 100 ng/ml EGF. Arrows indicate membrane ruffles formed after

EGF stimulation. The *lower panel* shows that ruffling leads to formation of macropinosomes (*arrows*). The large image to the left shows a cell 7 min after stimulation with 100 ng/ml EGF, and the small images show a time sequence during which macropinosomes are formed. Bars, 20 μ m.

Аутофосфорилирование рецептора запускает каскад киназ

L запускает об-е димера Цит. домен аутофос-ся R св-ет SH2 домен и ф-ет белок-мишень

